

RÉGULATION DE L'EXPRESSION ET LOCALISATION DE DEUX
DIGUANYLATE CYCLASES CHEZ *VIBRIO CHOLERAE*

par

Davina Cloutier

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, septembre 2010



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-70774-6
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-70774-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Le 1^{er} septembre 2010

*le jury a accepté le mémoire de Madame Davina Cloutier
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Vincent Burrus
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Kamal Bouarab
Membre
Département de biologie

Professeur François Malouin
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Le choléra est une grave maladie infectieuse qui sévit encore de nos jours à travers le monde. Elle affecte des milliers de personnes par année principalement en Afrique et en Asie du Sud-Est. L'agent responsable du choléra est la bactérie *Vibrio cholerae*. En plus d'infecter l'humain lorsqu'elle est ingérée via la consommation d'eau ou d'aliments contaminés, elle possède la capacité de survivre en milieux aquatiques, son habitat naturel. Dans son environnement marin, il est possible de retrouver *V. cholerae* attaché à des surfaces biotiques ou abiotiques grâce à sa capacité à former des biofilms. On peut également le retrouver sous forme planctonique. La transition entre ces deux modes de vie est favorisée par une petite molécule, le c-di-GMP. Le c-di-GMP est un messager secondaire ubiquitaire retrouvé chez les bactéries. En concentration intracellulaire élevée, il permet la régulation de différentes fonctions chez *V. cholerae* comme l'augmentation de la formation de biofilms, la diminution de la mobilité et de l'expression de gènes de virulence. Sa synthèse est catalysée par des enzymes appelés diguanylate cyclases (DGC), caractérisées par la présence d'un domaine GGDEF. On retrouve deux DGC, DgcK et DgcL, ainsi qu'une protéine de régulation, Mex07, sur certains éléments génétiques mobiles intégrés dans le chromosome de *V. cholerae*. Ces éléments sont nommés ICE pour *Integrating Conjugative Elements*. Ils possèdent la capacité de se transférer par conjugaison entre microorganismes suite au contact entre deux cellules, ce qui favorise leur dissémination. Cette étude porte sur la caractérisation de la régulation et de la localisation de DgcK, DgcL et Mex07 codées par ICEVchMex1. Des fusions transcriptionnelles des promoteurs de *dgkK* et de *dgkL* avec le gène *lacZ* ont été construites pour réaliser des essais β -galactosidase. La condition optimale déterminée permettant l'expression du promoteur *PdgkK* est une température de 37 °C. Celles permettant l'expression du promoteur *PdgkL* sont plutôt responsables de stress à la membrane comme la présence de sels biliaires. Les deux activités se complètent ainsi dans le contexte physiologique d'une infection, une combinaison de la température de croissance et de la présence de sels biliaires. La microscopie à épifluorescence a permis de localiser DgcK surexprimée à un pôle cellulaire

chez *V. cholerae*. DgcL et Mex07 surexprimées ne semblent pas se localiser toujours au même endroit chez les cellules. Des analyses bioinformatiques suggèrent que DgcL et Mex07 se localisent à la membrane interne de la cellule. La présence de domaines récepteurs de phosphate et histidine phosphotransférase sur ces protéines suggère fortement qu'elles interagissent de concert dans un système de transduction de signal à deux composantes. La dissémination des gènes codant ces protéines retrouvés sur des éléments génétiques mobiles donnera des indices quant à leur possible rôle dans l'adaptation et la persistance de divers microorganismes dans l'environnement.

REMERCIEMENTS

Je veux tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Vincent Burrus, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au cours de ces dernières années. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet qui m'aura été très gratifiant. J'ai pu approfondir mes connaissances et apprécier davantage la science en l'abordant d'un nouveau point de vue. Merci également pour votre disponibilité, vos précieux conseils et pour les nombreuses discussions intéressantes.

Je remercie mes conseillers, Dr François Malouin et Dr Kamal Bouarab, pour m'avoir accompagnée tout au long de l'avancement de mes travaux. Je suis reconnaissante pour vos précieux conseils et vos justes opinions.

Je remercie également personnellement chacun des membres présents et passés du laboratoire : Geneviève Garriss, Daniela Ceccarelli, Aurélie Daccord, Eric Bordeleau, Eric Brouillette, Dominic Poulin-Laprade, Christine Déry, Mariana Gabriela Ghinet, Ali Farrokhi et Etienne Brizard. Merci pour votre soutien et vos encouragements dans les bons moments comme dans les plus difficiles. Merci infiniment pour votre amitié et pour ces nombreux moments où nous avons eu tant de plaisir. Je garde en mémoire toute la joie que vous m'avez apportée. Vous côtoyer et travailler avec vous fut un honneur !

Je tiens aussi à remercier M. Gilles Grondin pour son aide, sa disponibilité et ses précieux conseils pour tout ce qui concerne la microscopie.

Finalement, je remercie spécialement ma famille. Merci infiniment d'avoir toujours été présents pour moi. Votre soutien, vos encouragements et votre amour m'ont permis de mieux avancer et de ne jamais abandonner !

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE.....	i
REMERCIEMENTS	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
ABRÉVIATIONS.....	vii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
I.1 <i>Vibrio cholerae</i> : l'agent causal du choléra.....	1
I.1.1 Le choléra.....	1
I.1.2 Épidémiologie	2
I.1.3 Pathogenèse.....	4
I.2 Les ICE.....	6
I.2.1 La régulation du transfert des ICE	7
I.2.2 Squelette de gènes conservés et régions variables des ICE de la famille SXT/R391	10
I.2.3 Caractérisation d'ICE <i>VchMex1</i>	12
I.3 Le messager secondaire c-di-GMP	13
I.3.1 Le mécanisme de synthèse et de dégradation du c-di-GMP	14
I.3.2 Les récepteurs du c-di-GMP	17
I.3.2.1 Le domaine PilZ.....	17
I.3.2.2 La protéine FleQ.....	18
I.3.2.3 Les riborégulateurs.....	18
I.3.3 Les systèmes de transduction de signal à deux composantes régulant le c-di-GMP	19
I.3.4 Les phénotypes associés au c-di-GMP	20
I.3.5 Les applications du c-di-GMP	22
I.4 Première évidence de DGC retrouvées sur des éléments génétiques mobiles	23
I.5 Hypothèses et objectifs.....	27
CHAPITRE 1.....	28
MATÉRIEL ET MÉTHODES	28

1.1 Souches, plasmides et milieux de culture.....	28
1.2 Construction des souches	28
1.3 Construction des plasmides	31
1.4 Transformation	32
1.5 Essais β -galactosidase	33
1.6 Production de protéines recombinantes.....	34
1.7 Vaccination animale	35
1.8 Extraction et purification des anticorps IgY des œufs.....	36
1.9 Essais immunologiques	37
1.10 Spécificité des anticorps sur des lysats bactériens.....	37
1.11 Microscopie à épifluorescence	38
1.11.1 Détection de la GFP.....	38
1.11.2 Détection par immunofluorescence	39
1.12 Fractionnement cellulaire	40
CHAPITRE 2.....	43
RÉSULTATS	43
2.1 Régulation de l'expression des gènes <i>dgcK</i> et <i>dgcL</i>	43
2.1.1 Contrôles négatifs pour la régulation de l'expression	43
2.1.2 Activité du promoteur <i>PdgcK</i> en fonction du temps et de la température de croissance.....	45
2.1.3 Activité du promoteur <i>PdgcK</i> dans différentes conditions de croissance	45
2.1.4 Activité du promoteur <i>PdgcL</i> en fonction du temps et de la température de croissance.....	48
2.1.5 Activité du promoteur <i>PdgcL</i> dans différentes conditions de croissance.....	48
2.2 Localisation intracellulaire des protéines DgcK, DgcL et Mex07	51
2.2.1 Localisation intracellulaire à l'aide de la GFPmut3	51
2.2.1.1 Contrôle positif de la GFPmut3.....	52
2.2.1.2 Localisation de la protéine recombinante DgcK::GFPmut3.....	53
2.2.1.3 Localisation de la protéine recombinante DgcL::GFPmut3	55
2.2.2 Localisation intracellulaire par immunofluorescence.....	57
2.2.2.1 Caractérisation d'anticorps en vue d'essais de localisation par microscopie à épifluorescence et par fractionnement cellulaire	58

2.2.2.1.1 Détermination des titres d'anticorps dirigés contre DgcK, DgcL et Mex07	58
2.2.2.1.2 Détermination de la spécificité des anticorps anti-DgcK, anti-DgcL et anti-Mex07 sur des lysats bactériens	60
2.2.2.2 Localisation de la protéine DgcK par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques.....	63
2.2.2.3 Localisation de la protéine DgcL par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques.....	66
2.2.2.4 Localisation de la protéine Mex07 par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques.....	69
2.2.3 Localisation des protéines DgcK, DgcL et Mex07 par fractionnement cellulaire ...	72
CHAPITRE 3.....	77
DISCUSSION.....	77
3.1 Conditions de régulation de l'expression du promoteur <i>PdgcK</i>	77
3.2 Localisation polaire de DgcK	81
3.3 Conditions de régulation de l'expression du promoteur <i>PdgcL</i>	84
3.4 Localisation de DgcL et Mex07	85
CONCLUSION	88
BIBLIOGRAPHIE	90

ABRÉVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ala : Alanine

Ap : Ampicilline

ARN : Acide ribonucléique

Asp : Acide aspartique

BSA : Albumine de sérum bovin, traduit de l'anglais *Bovine Serum Albumine*

Cm : Chloramphénicol

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DGC : Diguanylate cyclase

ELISA : *Enzyme-linked immunosorbant assays*

FRT : *FLP Recognition Target*

GFP : *Green Fluorescent Protein*

Glu : Acide glutamique

Gly : Glycine

g : Grammes

GST : *Glutathione S-Transferase*

GTP : Guanosine-5'-triphosphate

h : Heure

Hg : Mercure

HS : Points chauds d'insertion, traduit de l'anglais *Hotspots*

ICE: Éléments intégratifs conjugatifs, traduit de l'anglais *Integrating Conjugative Elements*

IPTG : Isopropyl 1-thio- β -d-galactopyranoside

kb : Kilopaires de bases

kD : Kilo Dalton

Km : Kanamycine

Leu : Leucine

L : Litre

mA : Milliampères

min : Minutes

mg : Milligrammes

mL : Millilitre

mM : Millimolaire

nM : Nanomolaire

ONPG : *o*-Nitrophenyl-beta-galactopyranoside

ORF : Cadre de lecture ouvert, traduit de l'anglais *Open Reading Frame*

pb : Paires de bases

PBS : *Phosphate Buffer Saline*

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne, traduit de l'anglais *Polymerase Chain Reaction*

PDE : Phosphodiesterase

PEG : Polyéthylèneglycole

Phe : Phénylalanine

PMSF : *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*

Pro : Proline

Sm : Streptomycine

Sp : Spectinomycine

Su : Sulfaméthoxazole

TCP : *Toxin-coregulated pilus*

Tm : Triméthoprim

TMB : 3, 3', 5, 5' Tetramethylbenzidine

Tyr : Tyrosine

UFC : Unité Formant Colonie

UTR : *Untranslated Regions*

V : Volts

VBNC : Viable mais non cultivable, traduit de l'anglais *Viable but non-culturable*

VPI : *Vibrio Pathogenicity Island*

VPS : *Vibrio Polysaccharide*

μg : Microgrammes

μL : Microlitre

μm : Micromètre

μM : Micromolaire

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Souches utilisées dans cette étude.	29
Tableau 2. Plasmides utilisés dans cette étude.	32
Tableau 3. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour cette étude.	33
Tableau 4. Concentrations en $\mu\text{g/mL}$ des protéines injectées lors de la vaccination.	36

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : L'agent étiologique du choléra : la bactérie <i>Vibrio cholerae</i>	2
Figure 2 : Localisation des différents loci sur les deux chromosomes de <i>V. cholerae</i> requis pour sa virulence.....	4
Figure 3 : Distribution mondiale des ICE de la famille SXT/R391.	7
Figure 4 : Représentation schématique du transfert conjugatif des ICE de la famille SXT/R391.....	8
Figure 5 : Représentation schématique de l'induction du transfert des ICE de la famille SXT/R391.....	9
Figure 6 : Comparaison de la structure des génomes de 13 ICE de la famille SXT/R391.....	11
Figure 7 : Analyse de la séquence de la région variable <i>s073-traF</i> de plusieurs ICE de la famille SXT/R391 démontrant des gènes prédits encodant des DGC.....	13
Figure 8 : Représentation schématique des diverses enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire par le c-di-GMP.	14
Figure 9 : L'aptamère à c-di-GMP retrouvé chez <i>V. cholerae</i>	19
Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines retrouvés chez DgcK, DgcL et Mex07.....	24
Figure 11 : Représentation schématique de la phosphorylation putative de DgcL par Mex07.....	26
Figure 12 : Expression du contrôle négatif à 37 °C et en présence de 0,04 % de sels biliaries et 0,1 % de Triton X-100.....	44

Figure 13 : Activité du promoteur <i>PdgcK</i> à 30, 37 et 42 °C.	46
Figure 14 : Activité du promoteur <i>PdgcK</i> à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaires et 0,1 % de Triton X-100.....	47
Figure 15 : Activité du promoteur <i>PdgcL</i> à 30, 37 et 42 °C et <i>PdgcK</i> à 37 °C.	49
Figure 16 : Activité du promoteur <i>PdgcL</i> à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaires et 0,1 % de Triton X-100 et <i>PdgcK</i> à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaires.....	50
Figure 17 : La GFPmut3 est présente partout dans le cytoplasme.	53
Figure 18 : Champ de la localisation intracellulaire de la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.....	54
Figure 19 : DgcK::GFPmut3 se localise à un pôle cellulaire en microscopie à épifluorescence.	55
Figure 20 : Champ de la localisation intracellulaire de la protéine recombinante DgcL::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.	56
Figure 21 : Localisation variable de DgcL::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.	57
Figure 22 : Détermination des titres d'anticorps.	59
Figure 23 : Test de spécificité des anticorps anti-DgcK, anti-DgcL et anti-Mex07 sur des lysats bactériens.....	61
Figure 24 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine DgcK en immunofluorescence.....	63
Figure 25 : DgcK se localise à un pôle cellulaire en immunofluorescence.....	64

Figure 26 : DgcK se localise à un pôle cellulaire en immunofluorescence avec la microscopie confocale.....	65
Figure 27 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine DgcL en immunofluorescence.....	66
Figure 28 : Localisation variable de DgcL en immunofluorescence.....	67
Figure 29 : Localisation variable de DgcL en immunofluorescence avec la microscopie confocale.....	68
Figure 30 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine Mex07 en immunofluorescence.....	69
Figure 31 : Mex07 se localise de façon diffuse en immunofluorescence.....	70
Figure 32 : Mex07 se localise de façon diffuse en immunofluorescence avec la microscopie confocale.....	71
Figure 33 : Localisation de DgcK par fractionnement cellulaire.	73
Figure 34 : Localisation de DgcL par fractionnement cellulaire.....	74
Figure 35 : Localisation de Mex07 par fractionnement cellulaire.....	76
Figure 36 : Localisation putative du site de liaison du facteur sigma de phase stationnaire RpoS (σ^S).	78
Figure 37 : Cascade de régulation impliquée dans le contrôle des gènes de virulence chez <i>V. cholerae</i>	79

INTRODUCTION

I.1 *Vibrio cholerae* : l'agent causal du choléra

I.1.1 Le choléra

Depuis 1817, sept pandémies de choléra ont déjà eu lieu (Pang *et al.*, 2007). En 1992, nous sommes entrés dans la huitième pandémie qui persiste malheureusement encore aujourd'hui (Schild *et al.*, 2008). Le choléra est la cause majeure de maladie dans les pays du tiers monde. Les populations y sont élevées et l'eau potable est rare. Les conditions d'hygiène sont également défavorables (Chatterjee *et al.*, 2007; Ghosh *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2009). Il touche plusieurs milliers de personnes principalement en Asie et en Afrique, mais aussi en Amérique du Sud (Begum *et al.*, 2006; Navaneethan and Giannella, 2008; Nelson *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 2009). Le choléra est causé par l'ingestion de la bactérie *Vibrio cholerae* lors de la consommation d'aliments et/ou d'eau contaminés (Nelson *et al.*, 2009). Ce pathogène facultatif doit cependant être ingéré en dose suffisamment élevée pour déjouer le système immunitaire inné de l'hôte. *V. cholerae* va coloniser le petit intestin de 12 à 72 heures avant l'apparition des premiers symptômes (Nelson *et al.*, 2009). La maladie apparaît suite au relâchement d'une entérotoxine. Elle est caractérisée par des crampes au niveau de l'estomac et des vomissements qui sont suivis par une diarrhée sécrétoire non-inflammatoire (Nelson *et al.*, 2009). La diarrhée permet le relâchement dans l'environnement de vibrios hyper infectieux et le maintien de la transmission entre individus. Des individus asymptomatiques et symptomatiques vont relâcher ces vibrios dans l'environnement, mais ce sont ces derniers qui contribuent le plus fortement à la dissémination (Nelson *et al.*, 2009). Aucune cure miracle n'a encore été découverte à ce jour. Le traitement de l'infection chez les patients atteints de choléra se fait via une réhydratation orale et l'injection de fluides et d'électrolytes par voie intraveineuse, combinées à la prise d'antibiotiques (Nelson *et al.*, 2009).

I.1.2 Épidémiologie

V. cholerae est une γ -protéobactérie à Gram négatif caractérisée par sa forme de bâtonnet incurvé (Figure 1). Elle fait partie de la famille des *Vibrionaceae* et est hautement mobile dû à la présence d'un unique flagelle polaire (Prescott *et al.*, 1995; Schild *et al.*, 2008).



Tirée de Waldor et RayChaudhuri (2000).

Figure 1 : L'agent étiologique du choléra : la bactérie *Vibrio cholerae*.

Même si certaines souches de *V. cholerae* possèdent la capacité d'infecter l'humain et de survivre dans son tractus gastro-intestinal, son habitat naturel regroupe divers environnements aquatiques comme les rivières, les estuaires et les eaux côtières (Blokesh and Schoolnik, 2007). Dans son écosystème marin, il peut s'associer à diverses structures biotiques comme des organismes aquatiques tels que le phytoplancton et le zooplancton, ou bien s'attacher à des composés abiotiques tel que la chitine, un composé des exosquelettes et des carapaces de crustacés (Meibom *et al.*, 2005; Schild *et al.*, 2008). *V. cholerae* adhère non seulement à des parois chitineuses mais possède la capacité de dégrader la chitine pour l'utiliser comme source de carbone et d'azote (Schild *et al.*, 2008). La chitine augmente également la compétence de *V. cholerae* pour l'acquisition de nouveau matériel génétique par transformation naturelle (Meibom *et al.*, 2005). Sa survie et sa persistance dans les environnements aquatiques sont ainsi favorisées mais aussi renforcées par sa capacité à former des biofilms (Schild *et al.*, 2008). La formation de biofilms par les procaryotes est nécessaire à leur pathogénèse et leur virulence. *V. cholerae* ne fait pas exception à cette règle (Karaolis *et al.*, 2005).

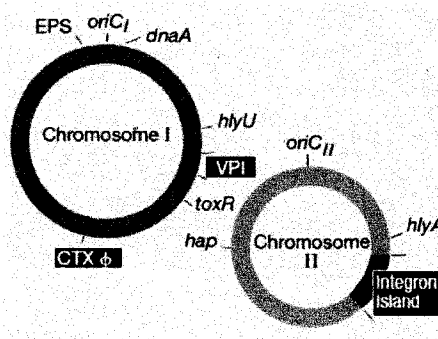
Les biofilms sont formés par l'association de communautés bactériennes, de même espèce ou non, qui vont adhérer, via la sécrétion d'une matrice extracellulaire, à différentes surfaces (Beyhan *et al.*, 2008; D'Argenio and Miller, 2004). Les bactéries se retrouvent ainsi protégées de leur environnement extérieur et d'une éventuelle prédation. Les biofilms forment des structures tridimensionnelles où sont assemblés des canaux. Ceux-ci permettent aux microorganismes de tous les niveaux du biofilm d'obtenir des nutriments et d'excréter leurs déchets métaboliques (Bomchil *et al.*, 2003). Chez *V. cholerae*, un des composés essentiels qui entre dans la formation de la structure tridimensionnelle des biofilms est l'exopolysaccharide VPS (*Vibrio Polysaccharide*) (Beyhan *et al.*, 2008). La capacité à former des biofilms en milieux aquatiques est associée à un phénotype rugueux chez *V. cholerae* tandis qu'un phénotype lisse est associé au passage chez l'hôte humain lors d'une infection (Yildiz *et al.*, 2004).

Il existe des souches cliniques et des souches environnementales de *V. cholerae*. Les souches cliniques responsables des sept premières pandémies de choléra sont de séro groupe O1. Les sérogroupes sont définis par l'antigène O qui est présent dans la partie polaire hydrophile des lipopolysaccharides retrouvés dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Chatterjee and Chaudhuri, 2003; Nelson *et al.*, 2009). Elles auraient évoluées d'un ancêtre environnemental à l'origine non pathogène pour les humains. (Schild *et al.*, 2008). Le séro groupe O1 est divisé en deux biotypes, El Tor et Classique. Ces derniers peuvent être à leur tour subdivisés en 2 sérotypes majeurs, soient Inaba et Ogawa (Nelson *et al.*, 2009). En 1992, un nouveau séro groupe a émergé, O139. L'émergence du séro groupe O139, au Bangladesh et en Inde, résulte d'une substitution de plusieurs gènes dans la région codante pour l'antigène O d'un clone d'une souche O1 El Tor apparue lors de la septième pandémie de choléra en 1961 (Chatterjee *et al.*, 2007; Nelson *et al.*, 2009). Il existe également des souches environnementales de *V. cholerae* présumées comme étant non pathogènes. Elles sont de sérogroupes non-O1 et non-O139. Bien qu'elles ne soient pas toxigéniques, elles ont tout de même été reportées comme agent causal de gastroentérites chez l'humain (Rahman *et al.*, 2008). Elles ont la capacité de mimer le choléra même si elles ne produisent pas la toxine

cholérique (Begum *et al.*, 2006). À ce jour, plus de 200 sérogroupes de *V. cholerae* ont été répertoriés (Chatterjee and Chaudhuri, 2003).

I.1.3 Pathogénèse

V. cholerae possède deux chromosomes circulaires, un de 2,96 millions de pb et un plus petit de 1,07 millions de pb (Figure 2). Sur le plus petit chromosome de *V. cholerae*, le chromosome II, on retrouve des gènes de fonctions cellulaires comme le transport des sucres, des ions métalliques et des anions. Un intégron est également présent sur ce chromosome. Il comprend des gènes putatifs et est proposé comme une source de variations génétiques (Chun *et al.*, 2009; Waldor and RayChaudhuri, 2000). Les intégrons sont des éléments d'expression génique qui acquièrent des cassettes de gènes (ORF pour *Open Reading Frames*) et les convertissent en gènes fonctionnels comme par exemple des cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques. Ils s'intègrent par recombinaison de façon site-spécifique (Mazel *et al.*, 1998).



Tirée de Waldor et RayChaudhuri (2000).

Figure 2 : Localisation des différents loci sur les deux chromosomes de *V. cholerae* requis pour sa virulence.

Sur le chromosome I, qui est le plus large, on retrouve principalement des gènes contrôlant des fonctions essentielles pour la cellule comme la réplication de l'ADN, la division cellulaire, la transcription, la traduction et la synthèse de la membrane. On retrouve également plusieurs

loci associés à la virulence de *V. cholerae* ainsi que des régulateurs de l'expression de gènes de virulence comme ToxR et ToxT (Waldor and RayChaudhuri, 2000). De plus, l'îlot de pathogénicité de *Vibrio* VPI (*Vibrio Pathogenicity Island*) est aussi localisé sur ce chromosome. Un facteur indispensable pour la colonisation de l'épithélium intestinal par *V. cholerae* est codé par cet îlot, le TCP (*Toxin-coregulated pilus*).

Le TCP est un récepteur reconnu par un bactériophage filamenteux à ADN simple brin nommé CTX ϕ (Boyd, 2010). Ce phage peut s'intégrer dans le chromosome ou bien se répliquer de façon extrachromosomale comme un plasmide (Dalsgaard *et al.*, 2001). Une seule ou plusieurs copies du génome de CTX ϕ peuvent s'intégrer à des sites spécifiques dans le génome de *V. cholerae*, généralement sur le chromosome I (Dalsgaard *et al.*, 2001; Maiti *et al.*, 2006). Il a été démontré qu'il peut tout de même s'intégrer sur le plus petit chromosome (Nandi *et al.*, 2003). Dans des conditions appropriées, il a été démontré que les souches toxigéniques de *V. cholerae* peuvent induire la production de particules extrachromosomiques du phage qui vont lui permettre de se propager dans d'autres souches (Faruque *et al.*, 1998). Ce phage lysogénique CTX ϕ transporte l'opéron de gènes *ctxAB* qui codent pour la toxine cholérique. Elle est responsable de la diarrhée aqueuse qui est le principal symptôme des patients colonisés par *V. cholerae* (Maiti *et al.*, 2006; Rahman *et al.*, 2008). La toxine cholérique est de type AB₅. Les 5 sous-unités B se lient aux cellules épithéliales intestinales et ces dernières internalisent la sous-unité A dont l'activité adénosine diphosphate ribosylase agit sur une sous-unité de la protéine G contrôlant l'activité adénylcyclase (Nelson *et al.*, 2009). La perte de fluides et d'électrolytes est donc stimulée chez les cellules intestinales.

L'expression des gènes *ctx* et *tcp* est coréglée par une cascade du système de régulation ToxR. ToxR est une protéine transmembranaire régulée par des signaux environnementaux. Elle va se lier sur la séquence nucléotidique en amont des gènes *ctxAB* et augmente leur expression. Elle permet également la régulation d'au moins 17 autres gènes qui font partie du régulon ToxR. On retrouve notamment les gènes codant pour des facteurs accessoires de colonisation, des porines et des lipoprotéines. ToxR interagit avec une autre protéine

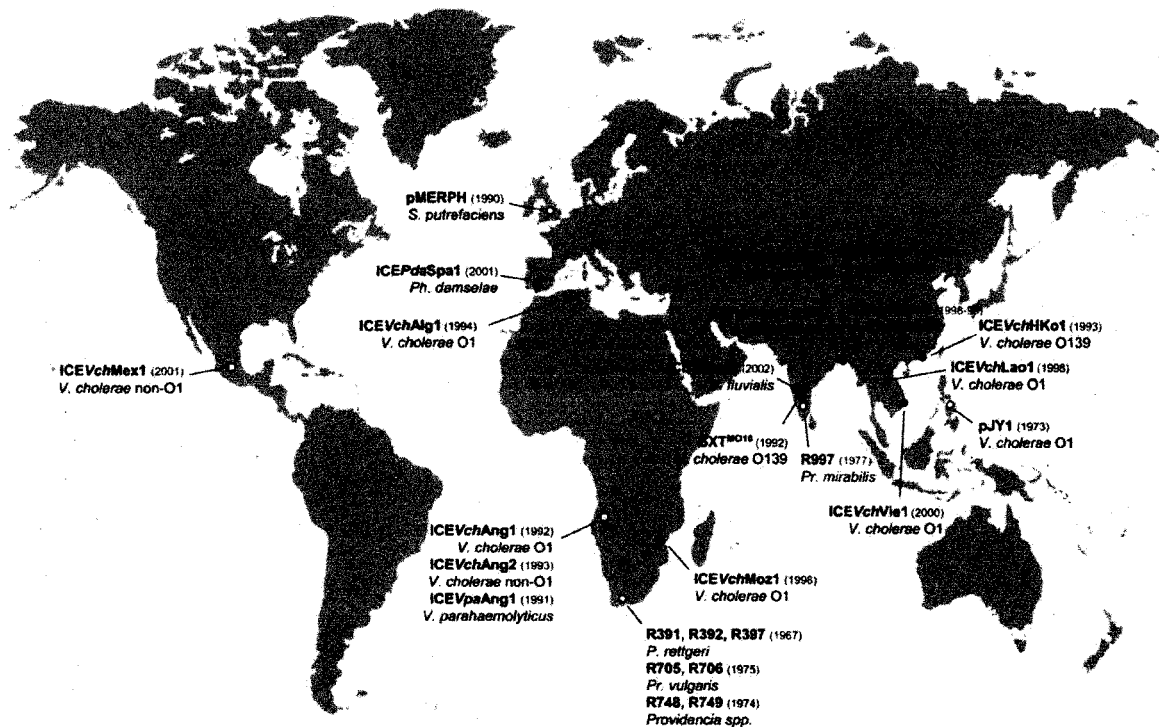
transmembranaire, ToxS, qui permet l'augmentation de l'activité de ToxR. Ce réseau de régulation comprend également d'autres régulateurs transcriptionnels encore à l'étude (Dalsgaard *et al.*, 2001; Faruque *et al.*, 1998). Les souches toxigéniques de *V. cholerae* sont donc caractérisées par la présence du gène de la toxine cholérique codé par le phage CTX ϕ intégré, ainsi que par les gènes codant pour le récepteur TCP (Dalsgaard *et al.*, 2001). Toujours sur le chromosome I, on retrouve un système de sécrétion de protéines (EPS pour *Extracellular Protein Secretion*) requis pour l'export de CTX ϕ , de la toxine cholérique et d'autres protéases (Waldor and RayChaudhuri, 2000). On retrouve également la présence d'autres éléments génétiques mobiles importants nommés par l'acronyme ICE pour *Integrating Conjugative Elements* (Burrus *et al.*, 2002).

I.2 Les ICE

Ce terme a été introduit pour la première fois par Burrus et ses collègues pour désigner des transposons conjugatifs (2002). Ces éléments génétiques mobiles ne sont pas exclusifs à *V. cholerae*. Les ICE sont retrouvés chez différents genres et espèces bactériens, à Gram positif et négatif, et contribuent au transfert horizontal de gènes (Burrus *et al.*, 2002; Wozniak and Waldor, 2010). La famille d'ICE SXT/R391 est une des plus vastes et des plus étudiées (Figure 3). Certains ICE qu'elle regroupe contribuent au transfert de gènes de résistances aux antibiotiques entre microorganismes pathogènes ou non (Burrus *et al.*, 2006a). Elle comprend des ICE détectés chez des isolats cliniques et environnementaux retrouvés sur 4 continents au cours des 40 dernières années (Burrus *et al.*, 2006a).

Cette famille a été nommée à partir de deux ICE. Le premier est SXT^{MO10}. Il a été découvert dans un des premiers isolats cliniques de *V. cholerae* O139 en 1992, à Madras en Inde. Il code pour des résistances à 4 antibiotiques : sulfaméthoxazole (Su), triméthoprim (Tm), chloramphénicol (Cm) et streptomycine (Sm) (Waldor *et al.*, 1996). Le second ICE est R391. Il a été découvert dans un isolat clinique de *Providencia rettgeri* en 1967, à Pretoria en

Afrique du Sud (Coetzee *et al.*, 1972). Il code pour des résistances à la kanamycine (Km) et au mercure (Hg) (Burrus *et al.*, 2006a).



Tirée de Burrus *et al.* (2006a).

Figure 3 : Distribution mondiale des ICE de la famille SXT/R391.

Sur cette carte sont représentés l'endroit et l'année d'où provient la souche de laquelle les ICE ont été isolés ainsi que le nom de l'organisme duquel ils ont été isolés.

I.2.1 La régulation du transfert des ICE

Les ICE possèdent la capacité de se transférer par conjugaison et s'intègrent dans le chromosome de leur cellule hôte avec lequel ils se répliquent (Burrus *et al.*, 2006a). Les principales étapes de leur transfert conjugatif sont représentées à la figure 4. Suite à un contact physique entre deux cellules bactériennes dont une porte en son génome un ICE, la régulation de leur transfert peut être initiée si les conditions environnementales y sont propices. Par exemple, un stress causé par les rayons ultraviolets peut induire le transfert d'un ICE.

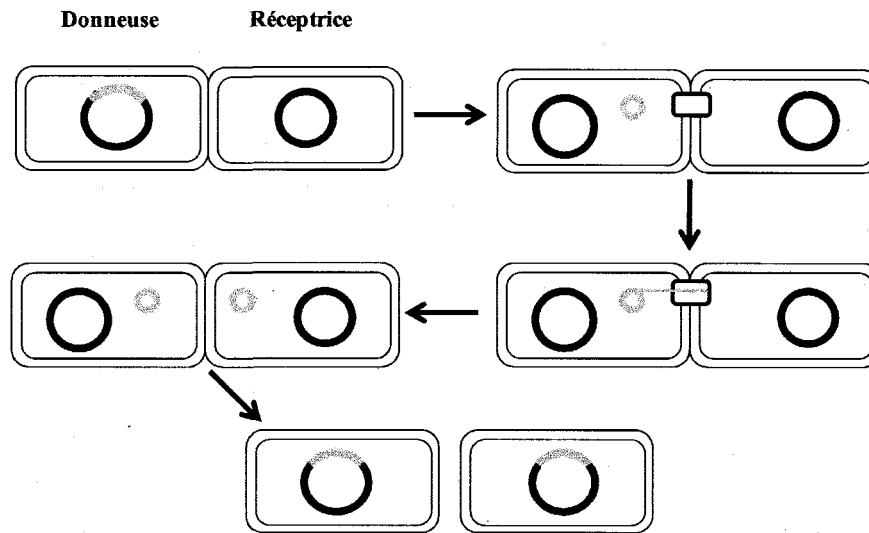


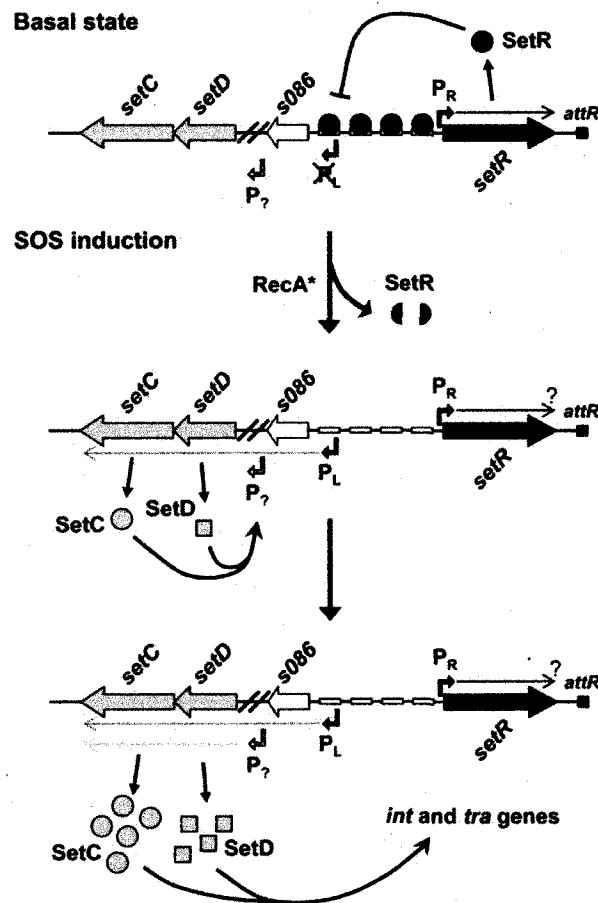
Figure 4 : Représentation schématique du transfert conjugatif des ICE de la famille SXT/R391.

Le chromosome est représenté en noir et l'ICE en gris. La cellule donneuse entre en contact avec la cellule réceptrice. L'ICE s'excise du chromosome à l'aide des protéines Int et Xis et prend une forme circulaire d'ADN double brin. Seulement une molécule d'ADN simple brin est ensuite transférée vers la cellule réceptrice via un pore de conjugaison et à l'aide des protéines de transfert Tra. Le brin complémentaire d'ADN est alors synthétisé dans les deux cellules et la molécule double brin intégrée au chromosome.

Trois étapes principales sont nécessaires au transfert de cet élément mobile. Tout d'abord, l'ICE doit s'exciser du chromosome de sa cellule hôte avec l'aide des protéines Int, une recombinase à tyrosine site-spécifique et Xis, une excisionase (Burrus and Waldor, 2003). L'ICE excisé forme une molécule d'ADN double brin circulaire dont seulement un brin sera transféré vers la cellule réceptrice via un pore de conjugaison synthétisé par l'ICE grâce aux gènes *tra* (Burrus *et al.*, 2006a; Lawley *et al.*, 2003). Une fois le simple brin d'ADN de l'ICE transféré dans la cellule réceptrice, le brin complémentaire d'ADN est resynthétisé à la fois dans la cellule donneuse et dans la cellule réceptrice. Ensuite, grâce à l'intégrase Int, l'ICE s'intègre à l'extrémité 5' du gène *prfC*, qui code pour une protéine impliquée dans la terminaison de la traduction (Beaber *et al.*, 2002; Burrus and Waldor, 2003). Le cycle peut alors recommencer aussi longtemps qu'il reste des cellules réceptrices.

Les gènes permettant le transfert des ICE ne sont pas constitutivement exprimés. Ils sont sous le contrôle du répresseur SetR (Figure 5). SetR réprime l'expression d'un promoteur situé en

amont de *s086* puisqu'il lie 4 opérateurs de transcription situés entre les gènes *s086* et *setR*. *s086* semble être le premier gène d'un opéron comprenant les gènes *setC* et *setD* (Beaber and Waldor, 2004). Les protéines SetC et SetD sont des activateurs de transcription des gènes *int* et *tra*, qui codent pour l'intégrase (Int) et les protéines de transfert (Tra), respectivement (Burrus *et al.*, 2006b). Elles stimulent également leur propre expression via un promoteur non caractérisé P_? (Burrus *et al.*, 2006a).



Tirée de Burrus *et al.* (2006a).

Figure 5 : Représentation schématique de l'induction du transfert des ICE de la famille SXT/R391.

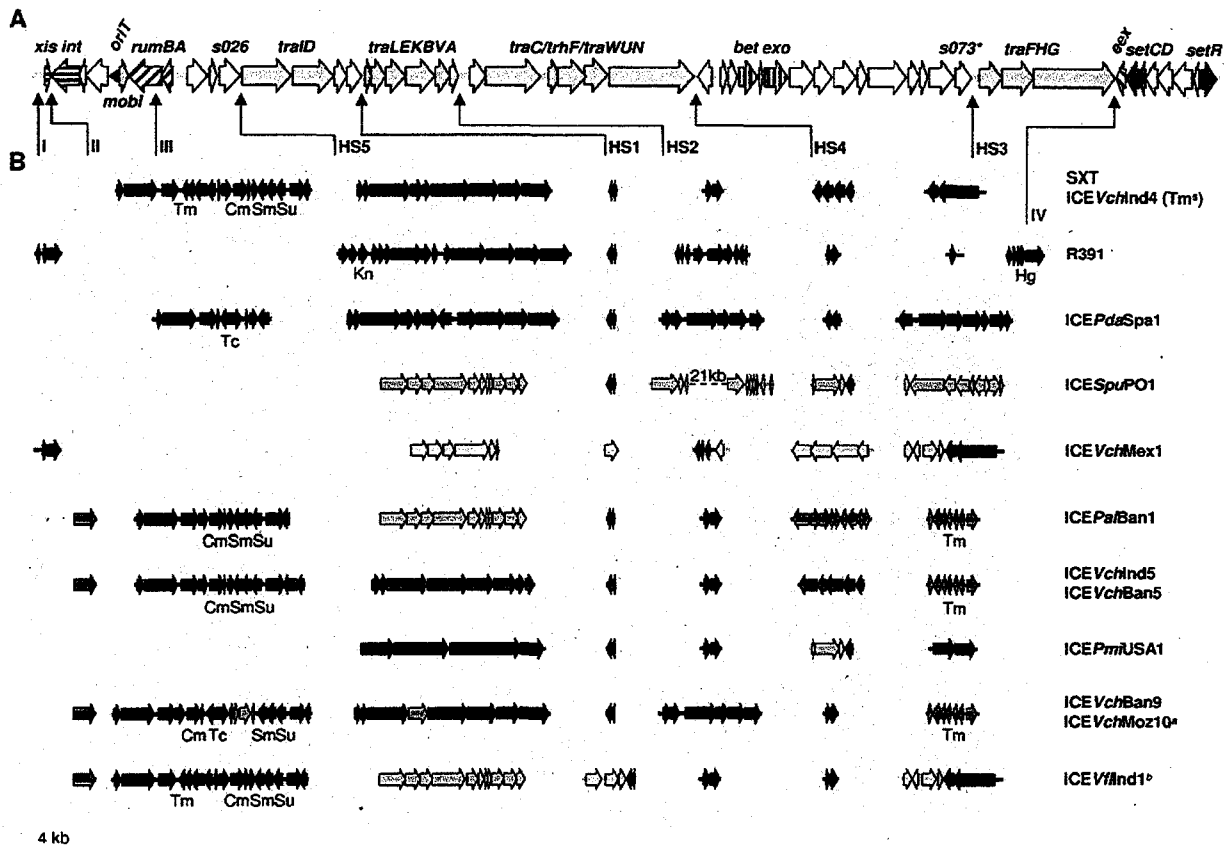
La protéine SetR se lie à 4 opérateurs de transcription entre les gènes *s086* et *setR*. SetR empêche l'expression d'un promoteur situé en amont de *s086*, empêchant la transcription d'un opéron incluant les gènes *setC* et *setD*, des activateurs de transcription des gènes *int* et *tra*. La réponse SOS est induite en présence d'agents causant des dommages à l'ADN qui stimulent la transcription via le promoteur P_L dans un contexte dépendant de *recA*. La protéine RecA permet l'autoprotéolyse de SetR. La répression des gènes *setC* et *setD* est donc levée, les protéines produites et le transfert induit. SetC et SetD stimulent également leur propre expression via un promoteur non caractérisé ($P_?$).

La répression par SetR est levée lorsque la réponse SOS est induite (Beaber *et al.*, 2004; Beaber and Waldor, 2004). Des dommages à l'ADN causés par la mitomycine C, un agent mutagène, la ciprofloxacine, un antibiotique, ou bien les rayons ultraviolets, un facteur environnemental, mènent à la production de fragments d'ADN simple brin. L'ADN sous forme simple brin est reconnu par RecA, qui devient alors activée. RecA activée stimule l'autoprotéolyse de SetR. La répression par SetR est donc levée et les gènes *setC* et *setD* sont transcrits. Ils vont ainsi activer la transcription des gènes nécessaires au transfert conjugatif de l'ICE (Burrus *et al.*, 2006b).

1.2.2 Squelette de gènes conservés et régions variables des ICE de la famille SXT/R391

Les ICE de la famille SXT/R391 possèdent un squelette de gènes conservés entre eux. En effet, une étude a révélé que le squelette de 13 ICE de cette même famille possède 52 gènes conservés (Figure 6A) (Wozniak *et al.*, 2009). Certains des gènes de ce squelette sont nécessaires à leurs fonctions comme l'intégration et l'excision (*int* et *xis*), le transfert conjugatif (*tra*) et la régulation (*setC*, *setD* et *setR*) ainsi que plusieurs autres de fonctions inconnues (Wozniak *et al.*, 2009). Il existe également une certaine variabilité au sein des ICE. Certaines insertions de gènes, comme par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques, sont apportées par des transposons (Burrus *et al.*, 2006a). Les intégrons contribuent également à la variabilité des ICE.

Des sites particuliers d'insertion, appelés points chauds d'insertion (*HS* pour *Hotspots*), sont également retrouvés sur le squelette de gènes commun des ICE. Des insertions de fragments, complètement différentes entre les ICE, sont trouvées à ces sites (Burrus *et al.*, 2006a). Les insertions localisées dans les *hotspots* sont de tailles variables pouvant aller jusqu'à des dizaines de kb. Elles ne diminuent cependant pas la stabilité et la mobilité des ICE (Figure 6B) (Burrus *et al.*, 2006a). La variabilité entre les ICE est donc énorme. En plus de coder pour des résistances à des antibiotiques, comme SXT^{MO10}, certains vont coder pour des résistances à des métaux lourds, comme c'est le cas pour R391 (Burrus and Waldor, 2004a).



Tirée de Wozniak *et al.* (2009).

Figure 6 : Comparaison de la structure des génomes de 13 ICE de la famille SXT/R391.

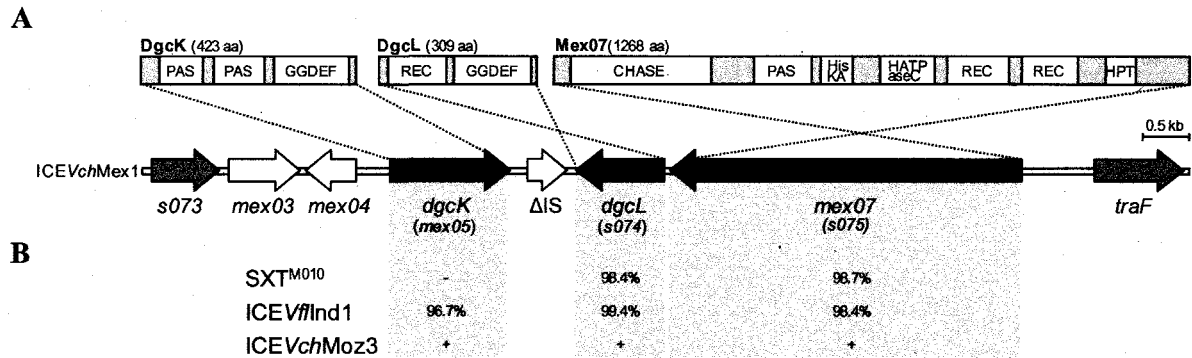
A. Les flèches représentent les gènes du squelette conservés des génomes de 13 ICE de la famille SXT/R391 analysés. B. Les régions variables sont représentées avec les couleurs propres aux éléments desquels elles ont été originalement décrites. SXT (bleu), R391 (rouge), *ICEPdaSpa1* (vert), *ICESpuPO1* (mauve), *ICEVchMex1* (jaune), *ICEPa/Ban1* (orange), *ICEVchInd5* (turquoise), *ICEPmiUSA1* (olive), *ICEVchBan9* (rose) et *ICEVflInd1* (vert pâle). Les flèches indiquent l'insertion de ces régions variables (*Hotspots*, HS1 à 5). Les chiffres romains indiquent des régions qui ne sont pas considérées comme des points chauds d'insertions.

Les ICE font donc partis de ces éléments qui, en apportant de nouveaux gènes à leur cellule hôte, contribuent à l'adaptation et à la colonisation de nouveaux environnement pour les bactéries (Burrus and Waldor, 2004b). Cependant, certains ICE ne codent pour aucune résistance. Ceci laisse suggérer qu'ils contribuent de façon différente pour avantager leur hôte. C'est le cas d'*ICEVchMex1* (Burrus *et al.*, 2006b).

I.2.3 Caractérisation d'ICE*VchMex1*

En 2001, à San Luis Potosi au Mexique, des eaux d'égouts recueillies ont permis l'isolement de souches environnementales de *V. cholerae*. La présence du gène *int*, qui code pour l'intégrase, et qui est hautement conservé chez les ICE de la famille SXT/R391, a été relevée chez 8 isolats. Une souche sur les 8 a été prise au hasard et analysée plus en profondeur. Il a été déterminé qu'elle contient dans son génome un ICE de la famille SXT/R391 qui a été nommé ICE*VchMex1*, le premier ICE découvert sur ce continent (Burrus *et al.*, 2006b). Cette souche, *V. cholerae* 1-010118-075, est résistante à l'ampicilline. Cependant, ce gène de résistance ne se trouve pas sur ICE*VchMex1*. Un gène de résistance à la spectinomycine a donc été introduit dans l'ICE pour tester sa capacité à se transférer par conjugaison et démontrer qu'il est fonctionnel. Les différentes analyses ont révélées que le transfert d'ICE*VchMex1* est induit de la même façon que celui de SXT (avec la mitomycine C), que son transfert se fait par le même mécanisme et que ces deux ICE s'intègrent dans le même locus chez leurs hôtes respectifs (Burrus *et al.*, 2006b).

ICE*VchMex1* possède également un squelette de gènes conservé similaire à celui retrouvé chez les ICE de la famille SXT/R391 mais possède différentes insertions dans ses points chauds d'insertion. C'est dans un de ces sites d'insertion que sont retrouvées des séquences intéressantes. En effet, on retrouve entre les gènes *s073* et *traF*, entre autres, les gènes *mex05*, *s074* et *s075* (Burrus *et al.*, 2006b) (Figure 7). L'analyse de cette séquence a révélée la présence de ces 3 gènes sur d'autres ICE de la famille SXT/R391 (Bordeleau *et al.*, 2010). Ces gènes ont déjà fait l'objet d'une étude par Bordeleau et ses collègues (2010). Ils ont démontré que *mex05* et *s074* codent pour des diguanylate cyclases (DGC) fonctionnelles impliquées dans la synthèse d'un messenger secondaire chez les bactéries, le c-di-GMP. *s075*, quant à lui, coderait pour une protéine de régulation impliquée dans l'activation enzymatique de S074. Les gènes *mex05* et *s074* ont été renommés par rapport à leur fonction enzymatique DGC *dgcK* et *dgcL* respectivement (Bordeleau *et al.*, 2010). S075 est nommée Mex07 pour cette étude.



Adaptée de Bordeleau *et al.* (2010).

Figure 7 : Analyse de la séquence de la région variable *s073-traF* de plusieurs ICE de la famille SXT/R391 démontrant des gènes prédits encodant des DGC.

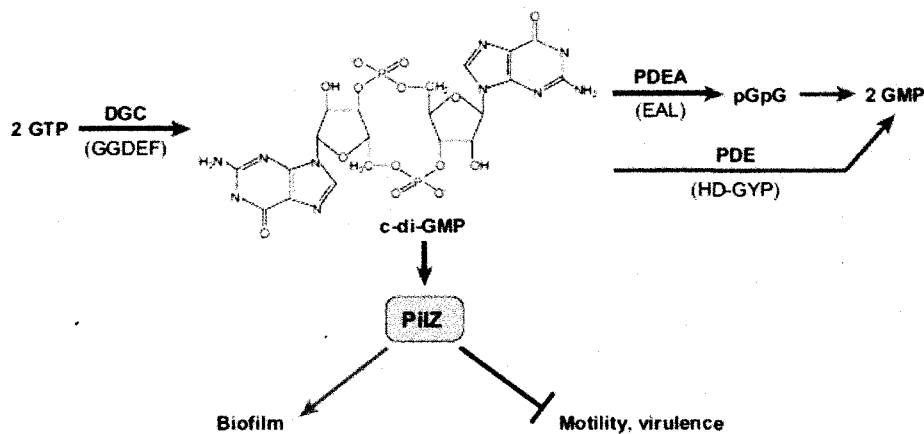
A. Représentation schématique de la région *s073-traF* d'ICEVchMex1 et des différents domaines prédits retrouvés chez DgcK, DgcL et Mex07. L'annotation précédente est indiquée entre parenthèses.
B. Pourcentage d'identité des gènes *dgkK*, *dgkL* et *mex07* retrouvés chez d'autres ICE de la famille SXT/R391 en fonction de ceux présents chez ICEVchMex1.

I.3 Le messager secondaire c-di-GMP

Le c-di-GMP, de son nom complet *bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP*, est un messager secondaire ubiquitaire exclusif aux Eubactéries (Jenal and Malone, 2006). Il a été identifié, isolé et caractérisé pour la première fois en 1987 par l'équipe de Moshe Benziman lors de travaux portant sur la synthèse de la cellulose chez la bactérie aérobie obligatoire *Gluconacetobacter xylinus* (anciennement nommée *Acetobacter xylinum*) (D'Argenio and Miller, 2004; Ross *et al.*, 1987; Schirmer and Jenal, 2009). Cette molécule a d'abord été décrite comme un activateur allostérique du complexe membranaire de la cellulose synthase, une enzyme impliquée dans la formation d'une matrice extracellulaire cellulosique composée de polymères de glucose liés par des liens β -1,4 (Cotter and Stibitz, 2007; D'Argenio and Miller, 2004; Tamayo *et al.*, 2007).

I.3.1 Le mécanisme de synthèse et de dégradation du c-di-GMP

Le c-di-GMP est en fait un ARN dinucléotide circulaire (Jenal and Malone, 2006; Sudarsan *et al.*, 2008). Il est synthétisé et dégradé par l'activité antagoniste de deux classes d'enzymes qui ne se retrouvent ni chez les Eucaryotes et ni chez les Archébactéries (Römling *et al.*, 2005). Sa synthèse est catalysée par des enzymes appelées diguanylate cyclases (DGC) (Figure 8) (Schirmer and Jenal, 2009).



Tirée de Tamayo *et al.* (2007).

Figure 8 : Représentation schématique des diverses enzymes impliquées dans la signalisation cellulaire par le c-di-GMP.

Les niveaux intracellulaires de c-di-GMP sont modulés par l'action d'enzymes antagonistes de synthèse, les DGC, et de dégradation, les PDE. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine GGDEF et EAL ou HD-GYP respectivement. Il est synthétisé via l'utilisation de 2 GTP par les DGC. Il est dégradé en pGpG par les PDE avec un domaine EAL et hydrolysé en 2 GMP ou dégradé directement en 2 GMP par les PDE avec un domaine HD-GYP. Le c-di-GMP lie différents récepteurs protéiques ou riborégulateurs pour réguler négativement l'expression de gènes de virulence et la mobilité, et réguler positivement diverses fonctions liées à la formation de biofilms.

Les DGC sont caractérisées par la présence d'un domaine catalytique conservé nommé GGDEF qui est composé d'environ 170 acides aminés (Ryjenkov *et al.*, 2005). Le domaine constitue à lui seul une unité protéique capable de repliement et fonctionnelle appelée structure globulaire (Wolfe and Visick, 2010). Le nom du domaine provient de la séquence du motif d'acides aminés GGDEF pour Gly – Gly – Asp – Glu – Phe (Römling *et al.*, 2005). Ce

motif peut être composé des acides aminés GGDEF ou GGEEF. Pour que l'activité enzymatique DGC soit conservée, les 5 résidus d'acides aminés du motif (GGD/EEF) doivent être intacts. Des changements d'acides aminés dans le domaine à l'extérieur du motif catalytique peuvent également affecter l'activité des DGC (Wolfe and Visick, 2010). La synthèse du c-di-GMP est enclenchée par la liaison d'une molécule de GTP au site actif (*A-site*) du domaine GGDEF (Jenal and Malone, 2006). Même si une protéine possède un domaine GGDEF, il n'est pas absolument certain qu'elle possèdera une activité DGC (Wolfe and Visick, 2010). Les DGC fonctionnent également en dimères, chaque monomère portant une molécule de GTP pour catalyser la réaction de formation de c-di-GMP (Stock, 2007; Wolfe and Visick, 2010).

La dégradation du c-di-GMP est catalysée par des enzymes caractérisées par la présence d'un domaine EAL ou HD-GYP, nommées phosphodiesterases (PDE) (Tamayo *et al.*, 2007). Le domaine EAL a été découvert en 1986 dans une séquence nucléotidique en cadre de lecture ouvert en amont des gènes déterminants de résistance au mercure chez le plasmide R100 et le transposon Tn501 (Brown *et al.*, 1986). Le nom de ce domaine est basé également sur le motif conservé de la séquence en acides aminés Glu – Ala – Leu. Ce domaine est composé d'environ 240 acides aminés et forme aussi une structure globulaire distincte. La présence de ce domaine ne garantit pas forcément que la PDE aura une activité enzymatique (Wolfe and Visick, 2010).

Le domaine HD-GYP, quant à lui, fait parti de la superfamille des phosphohydrolases métal-dépendantes (Aravind and Koonin, 1998). Il est composé par l'association de deux domaines indépendants, HD et GYP. Des domaines protéiques HD de cette superfamille ont également été retrouvés chez des PDE eucaryotes (Wolfe and Visick, 2010). Le nom de ce domaine provient du motif conservé de la séquence d'acides aminés Hys – Asp – Gly – Tyr – Pro (Römling *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2010). Encore une fois, la présence de ce domaine chez une protéine ne veut pas dire qu'elle possèdera son activité enzymatique de PDE (Wolfe and Visick, 2010). Donc, 2 classes de PDE contribuent ainsi à la dégradation du c-di-GMP. La

classe I comprend les PDE avec un domaine EAL et la classe II, celles avec un domaine HD-GYP (Wolfe and Visick, 2010).

Il a été démontré que certaines protéines, appelées protéines composites, possèdent un domaine GGDEF et EAL. Cependant, le mystère perdure quant à savoir comment ces protéines coordonnent leurs activités enzymatiques antagonistes (Wolfe and Visick, 2010). *P. aeruginosa* encode plusieurs protéines contenant différents domaines catalytiques, par exemple, 17 protéines avec un domaine GGDEF, 5 avec EAL, 3 avec HD-GYP et 16 avec les deux domaines GGDEF et EAL (Tamayo *et al.*, 2007). Les DGC et PDE ne sont pas non plus caractérisées par la présence d'un seul domaine. Elles possèdent d'autres domaines qui leur donnent encore plus de spécificité dans l'activation de leur domaine catalytique. En effet, on retrouve des protéines qui possèdent deux domaines actifs, GGDEF et EAL ainsi qu'un domaine capteur de signal PAS.

Ces domaines PAS possèdent la capacité de capter différents stimuli environnementaux ainsi que différents signaux intracellulaires. PAS est l'acronyme pour *period clock protein*, *aryl hydrocarbon receptor* and *single-minded protein*, qui représentent les différents types de protéines où se retrouvent ces domaines (Mougel and Zhulin, 2001). Les domaines PAS sont retrouvés chez certaines protéines impliquées dans la signalisation cellulaire cytoplasmique (Taylor, 2007). Ces domaines ont la capacité de lier différents ligands et détectent des stimuli tels que la lumière, l'oxygène, le potentiel redox et des petites molécules (Taylor, 2007). Certains cofacteurs contribuent à la spécificité de la détection des signaux en se liant au domaine PAS, comme c'est le cas pour la flavine mononucléotide par exemple (Bordeleau *et al.*, 2010; Taylor, 2007). La protéine ScrG retrouvée chez *V. parahaemolyticus* et caractérisée par la présence de multiples domaines (PAS-GGDEF-EAL) a fait l'objet d'une étude. Une version complète de ScrG a une activité enzymatique de PDE, tandis qu'une version tronquée pour son domaine EAL, a une activité fonctionnelle DGC (Kim and McCarter, 2007). Les protéines possédant un domaine GGDEF et un domaine EAL peuvent également posséder un domaine REC (Wolfe and Visick, 2010). Il est caractéristique à la régulation impliquée dans les systèmes de transduction de signal chez les bactéries (Tamayo *et al.*, 2007). La

caractérisation des protéines aux multiples domaines est donc très complexe. Les conditions environnementales et les différents signaux captés par les bactéries possédant ces protéines jouent ainsi un rôle clé dans la régulation de la synthèse et de la dégradation du c-di-GMP.

I.3.2 Les récepteurs du c-di-GMP

La régulation des niveaux intracellulaires de c-di-GMP peut être modulée par la rétro inhibition. L'existence d'un site d'inhibition *I-site* dans le domaine GGDEF des DGC permet une inhibition allostérique de l'activité de l'enzyme lorsque le c-di-GMP y est lié (Jenal and Malone, 2006). Pour être en mesure de moduler différents phénotypes, le c-di-GMP doit également se lier à un récepteur. Les récepteurs ne sont pas encore tous connus car il manque des informations quant à la nature et à la diversité des protéines capables de lier le c-di-GMP (Wolfe and Visick, 2010). Quelques récepteurs ont cependant été étudiés.

I.3.2.1 Le domaine PilZ

Certains récepteurs protéiques à c-di-GMP se caractérisent par la présence d'un domaine PilZ. Ce domaine a été nommé d'après la protéine de fonction inconnue PilZ retrouvée chez *P. aeruginosa* (Amikam and Galperin, 2006). Ce domaine est également présent chez des protéines de divers microorganismes (Wolfe and Visick, 2010). Ce domaine lie le c-di-GMP, ce qui permet le contrôle de phénotypes associés à la formation de biofilms et à la virulence (Cotter and Stibitz, 2007; Schirmer and Jenal, 2009). Certaines protéines contenant un domaine PilZ ont été démontrées comme contrôlant la mobilité du flagelle et impliquées dans la production de polysaccharides. D'autres ont également été démontrées comme agissant dans la régulation des protéines de sécrétion et la virulence sans, par contre, que les mécanismes soient connus (Wolfe and Visick, 2010).

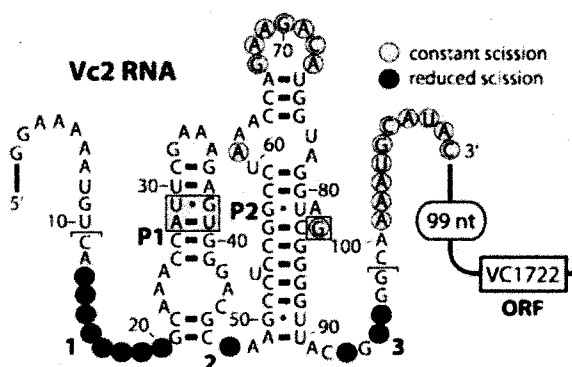
I.3.2.2 La protéine FleQ

Une équipe a démontré une nouvelle sorte de protéine liant le c-di-GMP, la protéine FleQ. Elle contrôle la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la synthèse du flagelle et dans la biosynthèse des exopolysaccharides (EPS) chez *P. aeruginosa*. Ils ont démontré que le c-di-GMP lié à FleQ empêche la répression de la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des EPS nécessaires à la formation de biofilms (Hickman and Harwood, 2008). FleQ a également été démontré comme régulant négativement l'expression d'un opéron impliqué dans la synthèse de la cellulose chez *P. fluorescens*. L'expression de ces gènes est aussi régulée par des concentrations élevées de c-di-GMP (Giddens *et al.*, 2007).

I.3.2.3 Les riborégulateurs

L'équipe de Sudarsan (2008) a révélé la présence d'un autre type de récepteur à c-di-GMP. Il s'agit d'un riborégulateur. Les riborégulateurs sont des segments d'ARN messager capables de lier de petites molécules et de contrôler l'expression de gènes. Ils adoptent des structures secondaires spécifiques qui forment un aptamère. L'aptamère est le site de liaison des ligands (Breaker, 2008; Sudarsan *et al.*, 2008). Les riborégulateurs sont spécifiques à leur ligand et sont capables de le reconnaître parmi plusieurs autres composés (Breaker, 2008). Les riborégulateurs ne sont pas exclusifs aux procaryotes. Quelques-uns ont été découverts chez des eucaryotes (Breaker, 2008). L'hypothèse de la présence d'un riborégulateur liant le c-di-GMP avait été émise car elle expliquerait la régulation au niveau transcriptionnel et traductionnel de beaucoup de gènes (Sudarsan *et al.*, 2008). Un domaine hautement conservé dans l'ARN a été découvert. Il se nomme GEMM (*Genes for the Environment, for Membranes and for Motility*) et se localise en amont de la séquence en cadre de lecture ouvert (ORF) d'enzymes DGC et PDE. On retrouve ce domaine notamment chez *V. cholerae* et *Geobacter sulfurreducens* (Weinberg *et al.*, 2007). Ce domaine dans l'ARN est caractéristique des riborégulateurs (Sudarsan *et al.*, 2008).

V. cholerae possède deux séquences d'ARN avec un domaine GEMM, Vc1 et Vc2 (Sudarsan *et al.*, 2008). La figure 10 représente un des riborégulateur à c-di-GMP retrouvé chez *V. cholerae* en amont du gène *VC1722* qui code pour une protéine similaire à celle impliquée dans la compétence naturelle de la bactérie (Meibom *et al.*, 2005). Le riborégulateur à c-di-GMP est le premier exemple connu d'ARN régulant des gènes par la liaison d'un messenger secondaire (Kulshina *et al.*, 2009). Plus de 500 exemples de ce riborégulateur à c-di-GMP ont été découvert dans la région 5' UTR (*Untranslated Regions*) des gènes retrouvés chez plusieurs bactéries (Smith *et al.*, 2009).



Tirée de Sudarsan *et al.* (2008).

Figure 9 : L'aptamère à c-di-GMP retrouvé chez *V. cholerae*.

Séquence nucléotidique et structure secondaire de l'ARN Vc2 présent sur deuxième chromosome de *V. cholerae* et se situant en amont de la séquence en cadre de lecture ouvert (ORF) du gène *VC1722*.

I.3.3 Les systèmes de transduction de signal à deux composants régulant le c-di-GMP

Plusieurs études publiées ont déjà démontré l'implication de DGC dans des systèmes de transduction de signal à deux composants. En effet, chez *Caulobacter crescentus*, on note la présence de la protéine PleD caractérisée par 2 domaines récepteurs dans sa partie N-terminale (Paul *et al.*, 2007). La phosphorylation de PleD par deux enzymes histidines kinases, PleC et DivJ, lui confère son activité et contribue à sa séquestration au pôle de différenciation (Paul *et al.*, 2007; Shapiro *et al.*, 2009). Des protéines similaires sont également présentes chez *Anaplasma phagocytophilum* et *Ehrlichia chaffeensis*, deux bactéries à Gram négatif de

l'ordre des *Rickettsiales* (Cheng *et al.*, 2006). Elles ont été nommées PleD et PleC due à leur homologie de séquence avec celles retrouvées chez *Caulobacter crescentus* (Cheng *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2009). L'activité DGC de PleD a été démontrée lorsqu'elle est phosphorylée par l'histidine kinase PleC. Cette interaction permet de les identifier comme faisant partie d'un système de transduction de signal à deux composantes (Cheng *et al.*, 2006; Kumagai *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2009). Chez *P. aeruginosa*, on retrouve la présence d'un système de transduction de signal Wsp (Tüzün Güvener and Harwood, 2007). Chez ce système, une étude a démontré la présence de la DGC WspR qui possède deux domaines récepteurs. Elle est phosphorylée par la protéine WspA, une kinase putative attachée à la membrane qui répond à des signaux de chemotaxisme (Tüzün Güvener and Harwood, 2007).

1.3.4 Les phénotypes associés au c-di-GMP

Plusieurs phénotypes sont associés à la régulation par le c-di-GMP de différentes fonctions physiologiques comme la signalisation intercellulaire, la formation de biofilms, la mobilité, la différenciation cellulaire et l'expression de gènes de virulence (Jenal and Malone, 2006; Schirmer and Jenal, 2009; Sudarsan *et al.*, 2008; Tamayo *et al.*, 2007). Beaucoup d'études ont démontré et/ou appuyé les phénotypes observés modulés par les niveaux intracellulaires ou extracellulaires de c-di-GMP. Chez plusieurs procaryotes, il est principalement impliqué dans la transition d'un mode de vie planctonique, donc libre, à celui de sédentaire en leur permettant de s'attacher à diverses surfaces par la formation de biofilms et ainsi favoriser leur survie en milieux aquatiques (Cotter and Stibitz, 2007). Son rôle dans la formation de biofilms a été suggéré par l'équipe de D'Argenio (2002) lors de l'identification d'un domaine GGDEF chez la protéine WspR. Son implication dans la formation de biofilms a été déterminé suite à l'apparition d'un phénotype rugueux chez des colonies de *P. aeruginosa* (D'Argenio *et al.*, 2002). En effet, le c-di-GMP lie la protéine PelD de *P. aeruginosa* pour activer la production de polysaccharides. PelD est une protéine codée par un gène situé dans l'opéron *pel* pour la synthèse d'exopolysaccharides (Lee *et al.*, 2007). Elle est cependant différente des autres protéines capables de lier le c-di-GMP, comme PilZ. Le c-di-GMP liant le *I-site* de PelD permet l'activation des gènes *pel* pour la synthèse d'exopolysaccharides au lieu d'inhiber son

activité DGC (Lee *et al.*, 2007). PelD peut également être identifié comme une nouvelle classe de récepteurs à c-di-GMP.

Chez *V. cholerae*, la transition entre les phénotypes lisse et rugueux, associés respectivement aux modes de vie planctonique et sédentaire, est ainsi modulée par le c-di-GMP (Waters *et al.*, 2008). Le c-di-GMP active l'expression des gènes *vps* (*Vibrio* *Exopolysaccharide* *Synthesis*) impliqués dans la formation de biofilms via les activateurs de transcription VpsT et VpsR (Beyhan *et al.*, 2007; Tischler and Camilli, 2004). Des DGC et de PDE ont également été démontrées comme régulant la mobilité et l'expression des gènes de virulence chez *V. cholerae* (Wolfe and Visick, 2010). En effet, une étude a démontré que des niveaux intracellulaires élevés de c-di-GMP diminuent l'expression des gènes de la toxine cholérique, *ctxAB*, du à la réduction de l'expression du gène *toxT* impliqué lui-même dans la cascade de signalisation de l'expression de ces gènes (Beyhan *et al.*, 2006).

Les effets du c-di-GMP ont également été démontrés chez *Caulobacter crescentus* pour ses effets au niveau de la mobilité de la bactérie. En effet, la DGC PleD, dont l'activité est dépendante de sa phosphorylation, est responsable de la différenciation du pôle qui permet la mobilité ou l'état permettant l'attachement de la cellule (*stalked cell*) (Paul *et al.*, 2004). L'importance de la distribution spatiale du c-di-GMP a également été suggéré chez *C. crescentus* vue son implication dans la différenciation cellulaire (Wolfe and Visick, 2010).

Les DGC et les PDE se retrouvent chez une multitude de procaryotes et contrôlent diverses fonctions en régulant les niveaux de c-di-GMP. *V. cholerae* est cependant un organisme de choix pour l'étude du c-di-GMP. Effectivement, il possède 31 protéines avec un domaine GGDEF, 12 avec EAL, 10 avec GGDEF et EAL, 9 avec HD-GYP et 4 avec PilZ (Beyhan *et al.*, 2008). Bien qu'il possède autant de protéines impliquées dans la régulation du c-di-GMP, elles ne sont cependant pas toutes actives dans le contexte de laboratoire et ne régulent pas toutes les mêmes phénotypes. Certaines de ces protéines ne répondent pas non plus aux mêmes signaux environnementaux. Celles impliquées dans l'expression des gènes de virulence ne seront pas activées par les mêmes signaux que celles impliquées dans la

formation de biofilm. Une étude a en effet démontré que la PDE VieA retrouvée chez *V. cholerae* contribue à maintenir une faible concentration de c-di-GMP intracellulaire sous des conditions qui ne favorisent pas la formation de biofilms (Tischler and Camilli, 2004).

I.3.5 Les applications du c-di-GMP

Le c-di-GMP peut également être utilisé différemment compte tenu de ces multiples fonctions. Par exemple, l'effet antimicrobien du c-di-GMP a été étudié. Des concentrations élevées de c-di-GMP extracellulaire ont démontré un effet de suppression de la formation de biofilms chez des souches pathogènes humaines, dont MRSA (*Methicillin-resistant S. aureus*), et bovines de *S. aureus* ainsi qu'une inhibition de l'interaction entre les cellules de ces mêmes souches (Karaolis *et al.*, 2005). Le même effet de suppression de la formation de biofilms a également été démontré chez *P. aeruginosa* (Ishihara *et al.*, 2009; Karaolis *et al.*, 2005).

Le c-di-GMP a aussi été suggéré pour des utilisations cliniques suite à ses propriétés comme agent immunostimulant permettant l'augmentation de la réponse immunitaire de l'hôte lors d'un modèle de mammite murin causée par *S. aureus* (Karaolis *et al.*, 2007). Il a également été démontré que le c-di-GMP affecte certains mécanismes de régulation cellulaire chez des lignées de cellules cancéreuses humaines. En effet, les cellules traitées avec le c-di-GMP seraient de plus petite taille et leur cycle de réplication cellulaire serait grandement perturbé dans leur phase S. Ce phénomène a été démontré comme étant spécifique au c-di-GMP (Amikam *et al.*, 1995). Il joue également un rôle dans l'augmentation de l'expression du récepteur CD4 des cellules immunitaires T CD4⁺ lorsque ces dernières sont traitées avec seulement 50 μ M de c-di-GMP (Steinberger *et al.*, 1999). Des études ont également démontré l'utilisation de cascades dépendantes du c-di-GMP lors de la synthèse de la cellulose chez les plantes où une saponine agit comme un inhibiteur spécifique de l'activité DGC (Tal *et al.*, 1998).

I.4 Première évidence de DGC retrouvées sur des éléments génétiques mobiles

Comme démontré précédemment, une variété de microorganismes possèdent constitutivement des gènes codant pour ces enzymes impliquées dans la régulation du c-di-GMP. Au laboratoire, notre équipe a cependant fait une percée en démontrant la présence de DGC fonctionnelles localisées sur des éléments génétiques mobiles (Bordeleau *et al.*, 2010). Les gènes *dgcK* et *dgcL* localisés sur l'élément conjugatif ICE/*VchMex1* isolé d'une souche environnementale de *V. cholerae*, comme décrit plus haut (Figure 7), codent pour des DGC (Bordeleau *et al.*, 2010). L'analyse bioinformatique effectuée par le logiciel *Pfam* et les résultats récupérés sur *GenBank* (numéro d'accès ABA87033.1) pour DgcK ont déterminé la présence de deux domaines PAS et d'un domaine GGDEF (Figure 10). Ces domaines comprennent respectivement les acides aminés des positions 36 à 122, 142 à 244 et 261 à 411. Une seconde analyse effectuée à l'aide du programme *PredictProtein* a révélé que les acides aminés des positions 145 à 162 constituent une région formant une hélice transmembranaire (Rost *et al.*, 1996). Bordeleau *et al.* (2010) ont établi la liaison de la flavine mononucléotide (FMN) de façon non covalente à un des deux domaines PAS de la protéine native DgcK. Ils ont également démontré l'activité DGC de DgcK via son domaine GGDEF par des essais de formation de biofilms, de mobilité et par la création d'un mutant du site actif du motif catalytique qui abolit l'activité enzymatique de la protéine. Ils ont également confirmé son activité DGC par des essais *in vitro* de synthèse de c-di-GMP avec du GTP marqué radioactivement. Il a été suggéré que DgcK serait capable de détecter des signaux de potentiel d'oxydoréduction via l'oxydation du FMN lié à un de ses domaines PAS. Cette interaction permettrait de moduler l'activité de son domaine GGDEF (Bordeleau *et al.*, 2010). Une autre analyse réalisée à l'aide du logiciel *pSort* suggère que DgcK est une protéine cytoplasmique avec un degré de certitude de 0,108, les autres degrés affirmant des localisations différentes étant tous nuls. Ceci permet donc de suggérer que DgcK localisée dans le cytoplasme possède la capacité de détecter des signaux à la membrane cytoplasmique. Le poids moléculaire de 47,2 kD de DgcK a été déterminé à l'aide du logiciel informatique *Science Gateway*.

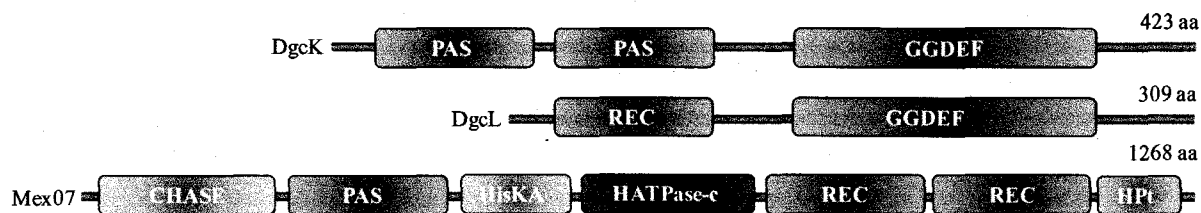


Figure 10 : Représentation schématique des différents domaines retrouvés chez DgcK, DgcL et Mex07.

Les mêmes analyses ont été réalisées pour DgcL. L'analyse bioinformatique effectuée par le logiciel *Pfam* et les résultats récupérés sur *GenBank* (numéro d'accèsion ABA87032.1) ont déterminé la présence d'un domaine REC et d'un domaine GGDEF (Figure 10). Ils comprennent respectivement les acides aminés des positions 19 à 132 et 146 à 304. Bordeleau *et al.* (2010) ont réalisés les mêmes essais que ceux effectués pour DgcK pour démontrer son activité DGC. Par contre, les essais *in vitro* de synthèse du c-di-GMP à partir de GTP radioactif n'ont pas fonctionné. Ils ont cependant réussi à démontrer son activité DGC par des essais de phosphorylation *in vitro* avec de l'acétyl phosphate qui ont révélé que DgcL est active pour synthétiser le c-di-GMP seulement lorsqu'elle est phosphorylée. Une autre analyse réalisée avec le logiciel *pSORT* a prédit que DgcL est une protéine retrouvée dans la membrane interne avec un degré de certitude de 0,070. Les degrés pour des localisations différentes sont tous nuls. Le poids moléculaire de 34,27 kD de DgcL a été déterminé par le logiciel *Science Gateway*. Puisque DgcL doit être phosphorylée pour être en mesure de synthétiser le c-di-GMP, Bordeleau *et al.* (2010) ont émis l'hypothèse qu'elle serait phosphorylée par Mex07 (S075). La distance intergénique entre les gènes *dgcL* et *mex07* qui est de seulement 6 pb ainsi que leur orientation dirigée dans un même sens suggèrent la possibilité qu'ils soient organisés en opéron et donc régulés de la même façon (Figure 7) (Bordeleau *et al.*, 2010).

Les mêmes analyses bioinformatiques ont ensuite été réalisées pour Mex07. L'analyse bioinformatique effectuée par le logiciel *Pfam* et les résultats récupérés sur *GenBank* (numéro d'accèsion ABA87031.1) ont déterminé la présence de plusieurs domaines (Figure 10). On

retrouve un domaine senseur CHASE, un domaine PAS, HisKA, ATPase_c, deux domaines REC et un domaine HPt. Ils comprennent respectivement les acides aminés des positions 85 à 274, 395 à 513, 534 à 597, 653 à 758, 786 à 907, 932 à 1044 et 1098 à plus de 1160. Le nom CHASE de ce domaine est l'acronyme pour *cyclase/histidine kinases associated sensing extracellular* (Mougel and Zhulin, 2001). Ces domaines ont une taille qui varie de 200 à 230 acides aminés (Anantharaman and Aravind, 2001). Ils sont retrouvés dans la partie extracellulaire ou périplasmique des protéines ayant une fonction de récepteur et sont prédits comme ayant la capacité de lier différents ligands chez les eucaryotes comme chez les procaryotes (Anantharaman and Aravind, 2001; Mougel and Zhulin, 2001). En aval du domaine CHASE, la prédiction révèle la présence d'un domaine PAS dont la fonction a été décrit précédemment. Le domaine prédit suivant est un domaine HisKA pour *histidine kinase A*. Il est impliqué comme domaine accepteur de phosphate chez les enzymes histidines kinases. Ce domaine est aussi reconnu pour sa dimérisation (Bilwes *et al.*, 1999). Les histidines kinases sont les enzymes qui permettent à leur hôte de détecter différents signaux pour ensuite enclencher la cascade de signalisation qui permettra l'adaptation comportementale de la bactérie vis-à-vis son environnement. Elles représentent une classe d'enzymes impliquées dans les systèmes de transduction de signal à deux composantes (Bilwes *et al.*, 1999). Le domaine suivant est un domaine HATPase_c qui représente le domaine ATPase caractéristique des histidines kinases. On note également la présence de deux domaines récepteurs de phosphate REC caractéristiques des protéines réceptrices constituant la deuxième partie des systèmes de transduction de signal à deux composantes, comme décrit précédemment. Le dernier domaine retrouvé chez Mex07 est le domaine HPt pour *histidine-containing phosphotransfer* (Janiak-Spens *et al.*, 2000). Ce domaine est essentiel à la fonction histidine kinase des protéines retrouvées dans un système de transduction de signal à deux composantes. Le résidu actif histidine est impliqué dans la phosphorylation de la protéine réceptrice du système (Kato *et al.*, 1997).

L'analyse réalisée avec le logiciel *PredictProtein* a révélé la présence d'une région transmembranaire qui comprend les acides aminés des positions 29 à 36 (Rost *et al.*, 1996). L'analyse avec le logiciel *pSort* suggère que Mex07 est une protéine localisée à la membrane

interne avec un degré de certitude de 0,272. Les autres degrés pour différentes localisations sont également tous nuls. Le poids moléculaire de 141,15 kD de Mex07 a été déterminé à l'aide du logiciel informatique *Science Gateway*.

La présence d'un domaine CHASE suggère la détection de signaux environnementaux qui permettraient d'enclencher la phosphorylation de DgcL. La présence de domaines REC sur la protéine histidine kinase Mex07 peut impliquer une autophosphorylation de la protéine et ensuite un transfert du groupement phosphate vers la protéine réceptrice DgcL. Ce phénomène est également retrouvé dans les systèmes de transduction de signal à deux composantes (Kato *et al.*, 1997). La présence d'un domaine histidine phosphotransférase (HPT) chez la protéine Mex07 suggère également qu'elle soit responsable de la phosphorylation de DgcL. La phosphorylation pourrait se faire de deux façons (Figure 11).

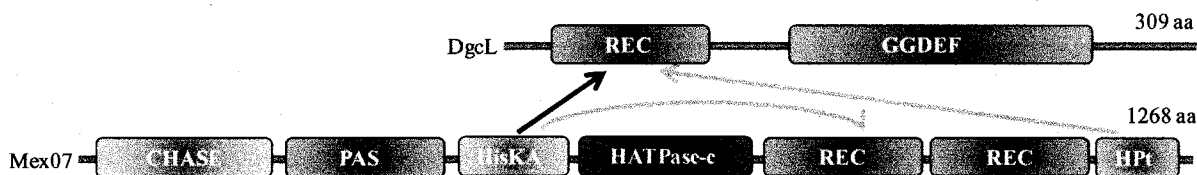


Figure 11 : Représentation schématique de la phosphorylation putative de DgcL par Mex07. La flèche noire représente la phosphorylation directe de DgcL à son domaine REC via le transfert de phosphate de Mex07 via son domaine HisKA. Les flèches grises représentent l'auto-phosphorylation de Mex07 à un de ses domaines REC par son domaine HisKA et le transfert de phosphate vers DgcL via son domaine HPT.

La flèche noire représente Mex07 qui pourrait phosphoryler de façon directe DgcL à son domaine récepteur de phosphate (REC) via son domaine histidine kinase A (HisKA). Les flèches grises représentent Mex07 qui pourrait s'auto-phosphoryler à un de ses domaines REC par son domaine HisKA et transférer ensuite un groupement phosphate au domaine REC de DgcL via son domaine HPT. En plus d'interagir ensemble, il a été suggéré que ces deux protéines font parties d'un signal de transduction de signal où DgcL est la protéine effectrice et Mex07, la protéine senseur qui joue un rôle pour leur régulation.

I.5 Hypothèses et objectifs

Les gènes *dgcK*, *dgcL* et *mex07* ainsi que les protéines pour lesquelles ils codent sont le sujet principal de cette étude. Comme cité précédemment, les protéines DgcK et DgcL ont déjà fait l'objet d'une publication par Bordeleau *et al.* (2010) où ils ont démontré leur fonction enzymatique DGC. Le but principal de cette étude était donc de continuer la caractérisation de ses enzymes pour mieux comprendre comment elles sont régulées afin d'envisager leurs rôles physiologiques chez *V. cholerae*.

Les hypothèses émises au commencement de cette étude étaient : A) L'expression des gènes *dgcK* et *dgcL* retrouvés chez ICEV*ch*Mex1 répond à différents signaux environnementaux, B) Le rôle des protéines DgcK, DgcL et Mex07 d'ICEV*ch*Mex1 est influencé par leur localisation et leurs différents domaines prédits et C) La protéine DgcL fait partie d'un système de transduction de signal à deux composantes avec la protéine Mex07.

Les objectifs étaient : 1) Déterminer la régulation de l'expression des gènes *dgcK* et *dgcL* dans différentes conditions expérimentales à l'aide d'essais β -galactosidase et 2) Déterminer la localisation intracellulaire des protéines DgcK, DgcL et Mex07 par l'utilisation de la microscopie.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Souches, plasmides et milieux de culture

Les souches et plasmides utilisés pour cette étude sont répertoriés dans les tableaux 1 et 2, respectivement. Les souches ont, la plupart du temps, été incubées dans le milieu commercial Luria-Bertani (LB) à 37 °C dans un incubateur avec une agitation de 225 rpm. Du milieu liquide LB fait en laboratoire : 10 g/L de Bacto tryptone (BD), 5 g/L d'extrait de levure (BD) et 10 g/L de chlorure de sodium (Laboratoire Mat) a été utilisé pour la reproductibilité de certaines manipulations. Le milieu BHI (*Brain Heart Infusion*) a été utilisé pour les transformations chez *V. cholerae*. L'induction du plasmide pGG2B a été réalisée avec une concentration finale de 0,02 % d'arabinose. Les plasmides dérivés de pBAD24 et pBADTOPO ont été induits avec une concentration finale de 0,2 % d'arabinose. Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline (Ap), 100 µg/mL; chloramphénicol (Cm), 20 µg/mL; kanamycine (Km), 50 µg/mL; spectinomycine (Sp), 50 µg/mL; streptomycine (Sm), 200 µg/mL; tétracycline (Tc), 12 µg/mL.

1.2 Construction des souches

Les amorces utilisées pour la construction des souches sont décrites dans le tableau 3. Les fusions transcriptionnelles chromosomiques des promoteurs des gènes *dgkK* et *dgkL* avec le gène *lacZ* ont été réalisées en utilisant la méthode mise au point par Ellermeier et son équipe (2002). Les plasmides suicides pCE36 et pCE37 ont été transformés par électroporation dans des souches possédant déjà le plasmide thermosensible pCP20. Le plasmide pCP20 est inductible à la chaleur et code pour la *FLP*, une enzyme responsable de la recombinaison spécifique entre les sites FRT (*FLP Recognition Target*). Les fusions transcriptionnelles résultent de la recombinaison site-spécifique entre le site FRT en amont du gène *lacZ* dans

pCE36 ou pCE37 et le site FRT résultant de la délétion de *dgcK* ou *dgcL* par la méthode de Datsenko et Wanner (2000). L'expression de la *FLP* a eu lieu à 37 °C pendant l'heure de croissance des cellules transformées par pCE36 ou pCE37. Les fusions transcriptionnelles des promoteurs des gènes *dgcK* et *dgcL* avec le gène *lacZ* ont été vérifiées par amplification PCR à l'aide des paires d'amorces eb4/Lac et eb1/Km pour la fusion $\Delta dgcK::lacZ$ et eb4/Km et eb1/Lac pour la fusion $\Delta dgcL::lacZ$. ICEVchMex1::*aad7* $\Delta dgcK::lacZ$ et ICEVchMex1::*aad7* $\Delta dgcL::lacZ$ ont été transférés par conjugaison de *E. coli* vers *V. cholerae* N16961 lac à l'aide du plasmide pGG2B. L'induction du plasmide pGG2B à l'arabinose permet l'expression des gènes *setC* et *setD* qui codent pour des activateurs du transfert conjugatif des ICE de la famille SXT/R391 (Beaber and Waldor, 2004).

Tableau 1. Souches utilisées dans cette étude.

Souches	Description	Référence ou source
<i>Vibrio cholerae</i>		
N16961	<i>lacZ</i> ⁺ , O1 El Tor, isolat clinique toxigène	Heidelberg <i>et al.</i> (2000)
N16961 lac ⁻	<i>lacZ</i> ⁻ , insertion de 50 pb dans le gène <i>lacZ</i>	Slamti and Waldor (2009)
1-010118-075	Non-O1/O139, 2001 Mexico, environnementale, ICEVchMex1	Burrus <i>et al.</i> (2006b)
DA54	N16961 lac ⁻ ICEVchMex1:: <i>aad7 dgcK::gfpmut3</i>	Cette étude
DA56	N16961 lac ⁻ ICEVchMex1:: <i>aad7 dgcL::gfpmut3</i>	Cette étude
DA114	N16961 lac ⁻ ICEVchMex1:: <i>aad7 ΔdgcK::lacZ</i>	Cette étude
DA118	N16961 lac ⁻ ICEVchMex1:: <i>aad7 ΔdgcL::lacZ</i>	Cette étude
DA142	N16961 lac ⁻ ICEVchMex1:: <i>aad7</i>	Cette étude
<i>Escherichia coli</i>		
BL21	F- <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i>	Stratagene
BW27784	<i>lacIq rrnB3ΔlacZ4787 hsdR514 DE(araBAD)567 DE(rhaBAD)568 DE(araFGH) φ(ΔaraEp P_{CP18}-araE)</i>	Khlebnikov <i>et al.</i> (2001)
CAG18439	MG1655 <i>lacZU118 lacI42::Tn10</i> (Tc ^R)	Singer <i>et al.</i> (1989)
VB48	CAG18439 ICEVchMex1:: <i>aad7</i>	Burrus <i>et al.</i> (2006b)
DA22	CAG18439 ICEVchMex1:: <i>aad7 dgcL::gfpmut3</i>	Cette étude
DA37	CAG18439 ICEVchMex1:: <i>aad7 dgcK::gfpmut3</i>	Cette étude
DA94	CAG18439 ICEVchMex1:: <i>aad7 ΔdgcK::lacZ</i>	Cette étude
DA98	CAG18439 ICEVchMex1:: <i>aad7 ΔdgcL::lacZ</i>	Cette étude
VB207	CAG18439 ICEVchMex1 $\Delta dgcK::FRT$	E. Bordeleau
VB208	CAG18439 ICEVchMex1 $\Delta dgcL::FRT$	E. Bordeleau

Les essais de conjugaison ont été réalisés à partir de cultures obtenues après une nuit d'incubation. Cent µL de cellules donneuses et 100 µL de cellules réceptrices ont été mélangés

et centrifugés 5 min à $5\,510 \times g$. Le culot a été resuspendu avec 200 μL de milieu LB et la suspension centrifugée 5 min à $5\,510 \times g$. Le culot a été resuspendu avec 10 μL de milieu LB. La goutte a été déposée sur une boîte Pétri de LB agar, sans antibiotique mais avec de l'arabinose pour l'induction de pGG2B, et incubée entre 5-6 h à 37°C . Les cellules ont été récupérées dans 1 mL de milieu LB et des dilutions en séries ont été effectuées. Les exconjugants ont été sélectionnés sur des boîtes Pétri de LB agar avec les antibiotiques Sp et Ap.

Les fusions traductionnelles chromosomiques des gènes *dgcK* et *dgcL* avec celui de la protéine fluorescente GFPmut3 ont été réalisées en utilisant la méthode publiée par Gerlach *et al.* (2007). Les gènes *gfpmut3* et *aph*, ce dernier codant pour la résistance à la kanamycine et bordé de sites FRT, ont d'abord été amplifiés par PCR à partir du plasmide p3174 avec les paires d'amorces Mex05GFPmut3-F/Mex05GFPmut3-R et Mex06GFPmut3-F/Mex06GFPmut3-R, respectivement pour *dgcK* et *dgcL*. Ces amorces contiennent 40 pb homologues à celles retrouvées au site d'insertion à des fins de recombinaison. Les produits PCR ont ensuite été digérés avec l'enzyme de restriction DpnI (*New England BioLabs*), pour éliminer l'ADN matrice de p3174 méthylé, et précipités à l'acétate de sodium. La précipitation à l'acétate de sodium a été réalisée par l'ajout d'un volume d'eau, d'1/5 de volume d'acétate de sodium 3 M à pH 5,2 et de 3 volumes d'éthanol 100 %. La précipitation a eu lieu à -20°C et le mélange a été centrifugé 30 min à $14\,549 \times g$ à 4°C . Le culot a été lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % et centrifugé 15 min à $14\,549 \times g$ à 4°C . Le culot a été resuspendu dans 5 μL d'eau et contenait les produits PCR concentrés. Ces derniers ont ensuite été électroporés chez une souche contenant le plasmide thermosensible pSIM5 codant pour le système de recombinaison Red du phage λ (Datta *et al.*, 2006). L'induction de pSIM5 pendant 15 min à 42°C a permis la recombinaison site-spécifique des produits PCR *dgcK::gfpmut3* et *dgcL::gfpmut3* chez ICEVchMex1::aad7. L'insertion des produits PCR a été vérifiée par amplification PCR à l'aide des paires d'amorces Cmex05GFPmut3-F/Cmex05GFPmut3-R et Cmex06GFPmut3-F/Cmex05GFPmut3-R, respectivement pour *dgcK* et *dgcL*. La cassette de résistance Km, composée du gène *aph* bordé de sites FRT, a été éliminée en exprimant la

recombinase FLP à partir de pCP20 à 42 °C. La délétion a été vérifiée par amplification PCR avec les paires d'amorces FTmex05-FOR/FTmex05-REV et FTmex06-FOR/FTmex06-REV, respectivement pour *dgcK* et *dgcL*. Les ICE contenant les fusions GFPmut3 ont été mobilisés à l'aide du plasmide pGG2B par transfert conjugatif comme décrit précédemment.

1.3 Construction des plasmides

Les amorces utilisées pour la construction des plasmides sont décrites dans le tableau 3. Le plasmide pGFPmut3 a été réalisé par l'amplification PCR du gène *gfpmut3* sur le plasmide p3174 à l'aide des amorces GFPM3F et GFPM3R et cloné dans un vecteur d'expression inductible à l'arabinose pBABTOPO (*Invitrogen*) selon les instructions du manuel. pGFPmut3 a été vérifié par digestion enzymatique. Les plasmides pDgcK::GFPmut3 et pDgcL::GFPmut3 ont été obtenus à partir de l'amplification PCR des fusions chromosomiques *dgcK::gfpmut3* et *dgcL::gfpmut3* en utilisant les paires d'amorces respectives FTmex05-FOR/FTmex05-REV et FTmex06-FOR/FTmex06-REV. Les fragments amplifiés ont ensuite été clonés dans pBABTOPO. Les constructions ont été vérifiées par digestion enzymatique et séquençage chez *DNA LandMarks* (Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc, Canada).

Pour la production et la purification de la protéine Mex07, le gène *mex07* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche *V. cholerae* 1-010118-075 en utilisant les amorces *Mex07-Frag1-F* et *Mex07-Frag2-R* et cloné en phase avec le cadre de lecture de la séquence codant pour la GST (*Glutathione S-transférase*) dans le site de restriction BamHI/XhoI du plasmide pGEX6P-1 (*GE Healthcare*). pMex07 a été vérifié par digestion enzymatique et séquencé chez *DNA LandMarks* (Saint-Jean-sur-Richelieu, Qc, Canada). Une mutation d'un nucléotide G → A à la position 3772 est présente et change l'acide aminé valine de la position 1258 en isoleucine. Le plasmide a tout de même été utilisé pour la production de la protéine recombinante puisque la mutation se trouve à la fin de Mex07 qui est une protéine de grande taille. La mutation n'a pas été considérée comme significative mais le plasmide devrait être reconstruit pour des essais enzymatiques ultérieurs.

Tableau 2. Plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmides	Description	Référence ou source
p3174	<i>aph</i> FRT Vecteur contenant la GFPmut3	Gerlach <i>et al.</i> (2007)
pBAD24	Ap ^R vecteur d'expression inducible à l'arabinose, haut nombre de copies	Guzman <i>et al.</i> (1995)
pCE36	<i>ahp</i> FRT <i>lacZY</i> ⁺ <i>t</i> _{his} oriR6K	Ellermeier <i>et al.</i> (2002)
pCE37	<i>ahp</i> FRT <i>lacZY</i> ⁺ <i>t</i> _{his} oriR6K	Ellermeier <i>et al.</i> (2002)
pCP20	<i>bla cat cI857</i> λ P _R <i>flp</i> pSC101 oriTS	Cherepanov and Wackernagel (1995)
pDgcK	pBAD24 contenant <i>dgkK</i> d'ICEVchMex1	Bordeleau <i>et al.</i> (2010)
pDgcL	pBAD24 contenant <i>dgkL</i> d'ICEVchMex1	Bordeleau <i>et al.</i> (2010)
pDgcK::GFPmut3	pBADTOPO contenant la fusion <i>dgkK::gfpmut3</i> d'ICEVchMex1	Cette étude
pDgcL::GFPmut3	pBADTOPO contenant la fusion <i>dgkL::gfpmut3</i> d'ICEVchMex1	Cette étude
pGG2B	Ap ^R pBAD30 <i>setCD</i>	G. Garriss
pGEX6P-1	Ap ^R vecteur de fusion génique avec la glutathione S-transférase inducible à l'IPTG	GE Healthcare
pGDgcK	pGEX6P-1 contenant <i>dgkK</i> d'ICEVchMex1	Bordeleau <i>et al.</i> (2010)
pGDgcL	pGEX6P-1 contenant <i>dgkL</i> d'ICEVchMex1	Bordeleau <i>et al.</i> (2010)
pGMex07	pGEX6P-1 contenant <i>mex07</i> d'ICEVchMex1	Cette étude
pGFPmut3	pBADTOPO contenant <i>gfpmut3</i> de p3174	Cette étude
pMex07	pBAD24 contenant <i>mex07</i> d'ICEVchMex1	E. Brouillette
pSIM5	Cm ^R λ RED <i>exo bet gal</i> pSC101 ori repA ^{ts}	Datta <i>et al.</i> (2006)
pVB60	pBAD24 contenant fusion <i>dgkK-His</i>	E. Brouillette
pVB61	pBAD24 contenant fusion <i>dgkL-His</i>	E. Brouillette

1.4 Transformation

Les plasmides pGFPmut3, pDgcK::GFPmut3 et pDgcL::GFPmut3 ont été introduits chez *V. cholerae* par électroporation en modifiant la méthode décrite par Occhino *et al.* (1998). Après une nuit d'incubation à 37 °C avec une agitation de 225 rpm, une culture a été diluée 1:100 dans 20 mL de milieu BHI. L'incubation a été poursuivie jusqu'à une densité optique à 600nm de 0,6. Les cellules ont été refroidies sur glace pendant 5 min et centrifugées 10 min à 3 000 × g à 4 °C. Les cellules ont été lavées 2 fois dans 20 mL de tampon G (137 mM de sucrose et 1 mM d'Hepes à pH 8,0) et centrifugées, entre et après les lavages, pendant 10 min à 3 000 × g à 4 °C. Les cellules ont été ensuite resuspendues avec 250 μ L de tampon G. Quarante μ L des cellules ont été électroporées avec 100 ng d'ADN plasmidique (2,4 kV, 25 μ FD, 200 ohms et 1 mm d'ouverture pour les cuvettes) (*Gene Pulser Xcell*, Biorad). Les cellules nouvellement

transformées ont été incubées pendant 1 h dans 1 mL de milieu BHI, puis ont été étalées sur une boîte Pétri de LB agar avec les antibiotiques Sp et Ap et purifiées.

Tableau 3. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour cette étude.

Nom	Séquence nucléotidique 5' vers 3'
Cmex05GFPmut3-R	ATTAACAAGGGTATCACCTTCAA
Cmex05GFPmut3-F	AGTTTTTGATCCTGCTTGAGA
Cmex06GFPmut3-F	AGTAACCGTGGCAAAAAAGA
s74-eb1	CCCGGGTGAGCAAGCAGTCGTGGT
mex05-eb4	CCCGGGAGCGGAAGAGAAAAACTCG
FTmex05-FOR	TAAGGAAGAGAAAAACTCGATGGGA
FTmex05-REV	TTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA
FTmex06-FOR	TAAAAAGAGTAGTTTATATGTCAGC
FTmex06-REV	TTATTTGTATAGTTCATCCATG
Km	TTTCTAGAGCTGTAAAAAGGACA
Lac	GACCATTTTCAATCCGCA
Mex05GFPmut3-F	CCAATAACGTTAGCTACCATGAACGAGTTTCCAAAAAATAGTAAAGGA
	GAAGAACTTTTC
Mex05GFPmut3-R	ATTTTACTTGATGGTATTTACGTGCAGGTGATATGTCGTCGTGTAGGCTG
	GAGCTGCTTC
Mex06GFPmut3-F	TAAACAACGTGGTCGTAATACCTATTCGGTTGTACTAGCGAGTAAAGGAG
	AAGAACTTTTC
Mex06GFPmut3-R	CTCATAGATAGTAATTTTTTGGTAATAGGTTTGCCAGACCCGTGTAGGCTG
	GAGCTGCTTC
Mex07-Frag1-F	NNGGATCCAAGTCACTTATCTCTGTTCCCAA
Mex07-Frag2-R	NNCTCGAGCTACTCTTTGAATTGACTTAACATTT

1.5 Essais β -galactosidase

Les essais β -galactosidase ont été réalisés en modifiant le protocole établi par Miller (1992). Des cultures en milieu liquide de 16 h ont été diluées 1:100 dans 100 mL de milieu LB fait en laboratoire et sans antibiotique. Trois échantillons de 1 mL ont été prélevés à différents temps d'incubation, soient 0, 2, 4, 6, 8, 24, 30, 48, 54 et 72 h. Les cultures ont été refroidies de 5 à 10 min et la densité optique à 600 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (*Ultrospec 2 100 pro*). En parallèle, le taux de survie des bactéries a été déterminé en étalant, sur des boîtes Pétri de LB agar avec les antibiotiques Sm et Km, différentes dilutions d'un seul des 3 échantillons prélevés. Pour initier la réaction, 500 μ L de tampon Z (16,1 g/L de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 g/L de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,75 g/L de KCl, 0,246 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à pH 7,1 et 2,7 mL de β -mercaptoéthanol) ont été ajoutés à 500 μ L de culture. Deux gouttes de

chloroforme et 1 goutte de SDS 0,1 % ont été ajoutées et le tout a été mélangé vigoureusement pendant 10 secondes pour lyser les cellules. Après une centrifugation de 5 min à $16\,873 \times g$, le surnageant a été récupéré et incubé à 30 °C pendant 5 min. Deux cents μL d'ONPG 4 mg/mL (*o*-Nitrophenyl-beta-galactopyranoside) ont été ajoutés pour initier la réaction d'utilisation du substrat par l'enzyme et l'incubation a été poursuivie à 30 °C dans l'obscurité jusqu'à l'obtention d'une coloration jaune. La réaction a ensuite été arrêtée en ajoutant 500 μL de Na_2CO_3 1 M et la densité optique a été mesurée à 420 nm. L'activité du promoteur a été calculée en Unités Miller par la formule modifiée de Miller (1992):

$$(1\,000 \times \text{D.O.}_{420}) / t \times v \times \text{D.O.}_{600}$$

où « D.O. » représente la densité optique aux différentes longueurs d'onde utilisées, soient 420 et 600 nm, « t », le temps, en minutes, de la réaction jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune satisfaisante et « v », le volume de la culture en mL.

Les expériences ayant été réalisées avec *V. cholerae*, nous avons éliminé de la formule le facteur de correction pour la dispersion de la lumière utilisé avec *E.coli* ($1,75 \times \text{D.O.}_{550}$) de la formule originale de Miller (1992) qui est :

$$(1\,000 \times \text{D.O.}_{420} - 1,75 \times \text{D.O.}_{550}) / t \times v \times \text{D.O.}_{600}$$

1.6 Production de protéines recombinantes

Des cultures de *E. coli* BW27784 contenant les plasmides pVB60 ou pVB61 ont été diluées 1:50 dans du milieu avec Ap et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0,6 et 0,8. L'expression des protéines a été induite et l'incubation poursuivie pendant 4 h. Les cellules ont été centrifugées et le culot resuspendu avec du tampon de lyse (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl et 8 M urée à pH 8,0) contenant 0,1 % de Tween (Sigma), 1 % d'inhibiteurs de protéases (*Protease Inhibitors Cocktail*, Sigma), 1 mM d'une solution de PMSF (*Phenylmethylsulfonyl Fluoride*, Sigma) et 1 mg/mL d'une solution de lysozyme (Sigma). Les cellules ont ensuite été lysées par sonication et purifiées en conditions dénaturantes en suivant les directives du manuel d'instructions *The QIAexpressionist* (QIAGEN). Une seconde méthode de production de protéines recombinantes a également été utilisée. Une culture de *V.*

cholerae N16961 contenant le plasmide pDgcK ainsi que des cultures de *E. coli* BL21 contenant les plasmides pDgcL ou pMex07 ont été diluées 1:100 dans du milieu 2X YTA (16 g/L de tryptone, 10 g/L d'extrait de levure et 5 g/L de NaCl) avec Ap et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0,6 et 0,8. L'expression des protéines a été induite avec 0,1 mM d'IPTG (*Isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside*, Amersham Biosciences) et l'incubation a été poursuivie pendant 4 h à 37 °C pour DgcK et pendant 6 h à 25 °C pour DgcL et Mex07. Les cellules ont été centrifugées et resuspendues dans du PBS 1X (*Phosphate buffer saline*) (8 g/L de NaCl, 0,2 g/L de KCl, 1,44 g/L de Na₂HPO₄ et 0,24 g/L de KH₂PO₄ à pH 7,4) contenant 1 % de Triton X-100 et d'inhibiteurs de protéases et ensuite lysées par sonication. DgcL et Mex07 ont été obtenues par chromatographie d'affinité en utilisant le kit *GST purification module* (GE Healthcare) avec la protéase *PreScission* (GE Healthcare) selon les instructions du manuel. Suite à l'élution des protéines purifiées selon les différentes méthodes employées, les protéines ont été dialysées entre 16 et 18 h dans des tubes *D-Tube Dialyser Maxi* (MWCO 12-14, Novagen) en utilisant du PBS 1X comme tampon, concentrées par centrifugation en utilisant des colonnes *Amicon Ultra-15* (MWCO 10, Millipore) et conservées à -20 °C. La concentration a été évaluée en utilisant le kit de dosage *BCA Protein Assay Kit* (ThermoScientific) et la pureté déterminée par SDS-PAGE.

1.7 Vaccination animale

Un protocole d'utilisation d'animaux de laboratoire a été établi et accepté par le comité d'éthique de l'expérimentation animale de l'Université de Sherbrooke. Des lapins femelles *New Zealand* ainsi que des poules ont été vaccinées avec les protéines recombinantes produites pour la production d'anticorps spécifiques dirigés contre les protéines DgcK, DgcL et Mex07. L'adjuvant *TiterMax Gold* (Sigma) a été utilisé pour la première injection et l'adjuvant incomplet de Freund (Sigma) pour les rappels selon les instructions du fabricant propres à chacun. Les injections pour les lapins ont été de type sous-cutanées et celles pour les poules, intramusculaires. Les concentrations en µg/mL de protéines injectées lors de la procédure de vaccination sont indiquées dans le tableau 4. Pour les lapins, du sang a été

recueilli dans des tubes *BD Vacutainer* de 7,5 mL (*BD*) avant la vaccination (pré-immun) et après les différents rappels. Le sérum a été séparé du sang par la technique décrite dans le manuel *Antibodies* (1989). Le sang a coagulé pendant 1 h à 37 °C et a été centrifugé 15 min à $3\,000 \times g$ à 4 °C. Le sérum a ensuite été récolté, séparé dans plusieurs tubes et conservé à -80 °C. Pour les poules, des œufs ont été récoltés avant la vaccination (pré-immun) et après les différents rappels. Les anticorps IgY, qui sont l'équivalent des IgG retrouvés dans le sérum, ont été extraits du jaune des œufs.

Tableau 4. Concentrations en µg/mL des protéines injectées lors de la vaccination.

Protéines	Lapins			Poules			
	Première injection	Rappel #1	Rappel #2	Première injection	Rappel #1	Rappel #2	Rappel #3
DgcK	603	228,5	225	160,3	91,4	100,5	-
DgcL	-	-	-	124,4	93,3	99,4	100
Mex07	498,4	150	75	-	-	-	-

1.8 Extraction et purification des anticorps IgY des œufs

Les anticorps IgY ont été extraits des jaunes d'œufs recueillis selon la méthode publiée par Tini *et al.* (2002). Le jaune a été séparé du blanc d'œuf à l'aide d'un séparateur et lavé à l'eau distillée. La membrane du jaune d'œuf a été percée et le jaune recueilli. Le volume a été ajusté à 25 mL avec du tampon sodium phosphate 100 mM à pH 7,6 avec 0,02 % de sodium azide. Le mélange a été agité vigoureusement et 20 mL de chloroforme ont ensuite été ajoutés. Une centrifugation de 30 min à $1\,200 \times g$ a permis de récupérer le surnageant qui a été précipité avec une concentration finale de 12 % p/v de PEG 6 000 (Polyéthylène glycole, *Fluka*, *Sigma*) et agité pendant 30 min. Après une centrifugation de 10 min à $14\,000 \times g$, les culots ont été resuspendus avec 2 mL de tampon sodium phosphate avec 0,02 % de sodium azide et conservés à -80 °C. Les anticorps ont été vérifiés sur gel SDS-PAGE où les chaînes légères et lourdes ont un poids respectif 27 et 67 kD (Dean Goldring and Coetzer, 2003).

1.9 Essais immunologiques

Des essais immunologiques ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assays*) ont été réalisés dans le but de déterminer la présence d'anticorps chez les différents animaux vaccinés en modifiant la méthode parue dans le manuel *Antibodies* (1989). Des plaques 96 puits (*Immuno plate 11*, VWR) ont été incubées pendant la nuit à 4 °C avec 100 µL d'antigène (protéines DgcK, DgcL ou Mex07) à une concentration finale de 200 à 500 ng/puits dans du tampon carbonate/bicarbonate (8,40 g/L de NaHCO₃ et 3,56 g/L de Na₂CO₃ à pH 9,6). Un blocage des sites libres a été réalisé avec 300 µL/puits d'une solution PBS 1X-lait 5 % p/v (lait en poudre écrémé de marque Carnation) pendant 1 h à 37 °C. Différentes dilutions des anticorps dans une solution PBS-lait 1 % p/v ont ensuite été ajoutées à raison de 100 µL/puits et les plaques incubées 2 h à 37 °C. Cent µL d'une dilution 1:2 000 de l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase (*Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule) peroxidase conjugate*, Sigma / *Anti-Chicken IgY (IgG) (Whole Molecule) peroxidase conjugate, Developed in rabbit*, Sigma) dans une solution PBS 1X-lait 1 % p/v ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque incubée 1 h à 37 °C. Cent µL de substrat TMB (3, 3', 5, 5' *Tetramethylbenzidine liquid substrate system for ELISA*, Sigma) ont été ajoutés dans les puits et la plaque incubée à l'abri de la lumière jusqu'à un bon développement de la couleur bleue (réaction entre 10 et 20 min). La réaction a été arrêtée avec 50 µL de HCl 2 N et la densité optique lue à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaques (*Sonics vibracell, Asys, UVM340*). Trois lavages de 5 min dans une solution PBS 1X-Tween 0,05 % ont été réalisés entre chaque étape mis à part celle avant l'ajout de TMB où le lavage a été effectué avec du PBS 1X.

1.10 Spécificité des anticorps sur des lysats bactériens

La méthode de spécificité des anticorps a d'abord été optimisée en suivant les instructions du manuel *Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system* (GE Healthcare). Des lysats bactériens ont été obtenus à partir de cultures bactériennes de 16 h. Un mL des cultures a été centrifugé 5 min à 5 510 × g à 4 °C et les culots ont été conservés à -20 °C. Ces derniers ont été resuspendus avec 500 µL de PBS 1X froid contenant 1 % de Triton X-

100 et d'inhibiteurs de protéases. Les cellules ont été lysées par sonication et le lysat dosé en utilisant le kit *BCA Protein Assay Kit*. Des concentrations entre 10 et 20 µg/mL de protéines des lysats bactériens ont été mises sur gel SDS-PAGE. Par immunobuvardage de type Western, les protéines ont ensuite été transférées sur membrane de PVDF (*PVDF Transfer Membrane, Mandel Scientific*) pendant une période de 75 min à un ampérage constant de 350 mA. La membrane obtenue a été incubée toute une nuit à 4 °C dans 50 mL d'une solution de blocage PBS 1X-Tween 0,1 %-lait 5 % p/v. Une dilution préalablement déterminée de l'anticorps primaire dans 50 mL de PBST a été ajoutée et la membrane a été incubée pendant 1 h à température ambiante avec agitation. La membrane a ensuite été incubée 1 h à température ambiante avec agitation dans 50 mL de PBST contenant 1:50 000 de l'anticorps secondaire couplé à la peroxidase. Des lavages avec du PBST ont été effectués entre chaque étape. En chambre noire et selon les indications du manuel indiqué précédemment, les réactifs A et B du kit *ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare)* ont été mélangés en proportion égale et appliqués sur la membrane. Après une minute d'incubation, le surplus de liquide a été éliminé de la membrane et cette dernière a été mise en contact avec un film (*Kodak BioMax light film, Sigma*) pendant une période déterminée. Le film a ensuite été révélé et fixé avec les produits de révélation et de fixation (*GBX fixer/replenisher, GBX developer/replenisher, Kodak processing chemicals for autoradiography films, Sigma*).

1.11 Microscopie à épifluorescence

1.11.1 Détection de la GFP

Cette méthode a été adaptée de celles publiées par Pogliano *et al.* (1999) et Sharp et Pogliano (1999). Des cultures de 16 h des souches contenant les plasmides pGFPmut3, pDgcK::GFPmut3 ou pDgcL::GFPmut3 ont été diluées 1:100 et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0,6 et 0,8. L'expression des protéines a été induite avec 0,2 % d'arabinose et l'incubation poursuivie pendant 1 h. La croissance des cellules a été arrêtée sur glace pendant 10 min. Cinq cents µL de cellules ont été centrifugés 1 min à $14\,549 \times g$. Le culot a été resuspendu avec 110 µL de milieu LB. Deux µL de cellules ont été déposés sur une

lame chargée positivement (*Superfrost/Plus*, Fisher). La culture sur la lame a été mélangée avec 0,5 µL de colorant DAPI 5 µg/mL dilué dans du PBS 1X (4',6-diamidino-2-phenylindole, dilactate, Invitrogen) et 0,5 µL de *Lipophilic Styryl Dye* FM4-64 (Invitrogen) 10 µg/mL dilué dans du HBSS 1X (5,33 mM de KCl, 0,441 mM de KH₂PO₄, 4,17 mM de NaHCO₃, 137,93 mM de NaCl et 0,338 mM de Na₂HPO₄). Le mélange a été recouvert d'une lamelle (*Premium Superslip*, Fisher) traitée à la poly L-lysine (Sigma). Les lames ont été visualisées en microscopie à épifluorescence à l'aide d'un microscope inversé (*Olympus IX70*). Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra (*Roper Scientific Photometrics*) et traitées avec les logiciels *Image-ProPlus* et *GIMP2*.

1.11.2 Détection par immunofluorescence

Cette méthode a été adaptée des celles publiées par Harry *et al.* (Harry *et al.*, 1995) et Lara-Tejero et Galan (Lara-Tejero and Galan, 2009). Des cultures de 16 h des souches contenant les plasmides pBAD24, pDgcK, pDgcL ou pMex07 ont été diluées 1:100 et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm entre 0,6 et 0,8. L'expression des protéines a été induite avec 0,2 % d'arabinose et l'incubation poursuivie pendant 1 h. Les cultures ont été refroidies dans la glace et 1 mL de culture a été centrifugé 10 min à 3 000 × g à 4 °C. Les cellules ont été resuspendues avec 200 µL d'une solution de PBS 1X contenant 4 % de formaldéhyde. Les cellules ont été fixées 30 min dans la glace, centrifugées 10 min à 3 000 × g à 4 °C et resuspendues avec 1 mL de PBS et ce, 2 fois. Vingt µL de la culture ont été placés sur une lame chargée positivement où un cercle fait avec un crayon de silicone avait préalablement été tracé. La culture a été séchée complètement sous un flux d'air dans l'enceinte biologique. Trois cents µL d'une solution de méthanol 50 % ont été appliqués sur la lame et cette dernière incubée 5 min à -20 °C. La lame a été séchée complètement comme indiqué précédemment. Trois cents µL d'une solution de blocage PBST-BSA 2 % (PBS 1X, 0,05 % Tween et 2 % BSA) ont été appliqués sur la lame et cette dernière a été incubée 15 min à température ambiante et lavée avec du PBST-BSA 2 %. Trois cents µL d'une dilution de 1:2 000 de l'anticorps primaire dans du PBST-BSA 2 % ont été ajoutés sur la lame et celle-ci incubée 1 h à température ambiante. Cinq lavages de 5 min avec du PBST-BSA 2 % ont été effectués et

300 µL d'une dilution de 1:2 000 de l'anticorps secondaire (*Alexa Fluor® 555 goat anti-chicken IgG (H+L) *2 mg/mL* ou *Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) *2 mg/mL*, *Invitrogen*) dans du PBST-BSA 2 % ont été appliqués sur la lame et celle-ci incubée 1 h dans l'obscurité à température ambiante. Cinq lavages de 5 min avec du PBST-BSA 2 % ainsi que 3 rinçages avec de l'eau ont été effectués et la lame a été séchée complètement comme indiqué précédemment. Trois cents µL de colorant DAPI 300 nM ont été appliqués sur la lame qui a été incubée 5 min. Trois lavages faits avec de l'eau ont été réalisés et la lame a été séchée complètement comme indiqué précédemment. Un montage avec du *ProLong Gold (ProLong® Gold antifade reagent, Invitrogen)* a été effectué et une lamelle a été déposée sur la surface minutieusement. L'incubation a été poursuivie pendant 24 h dans l'obscurité à température ambiante. Les lames ont été observées en microscopie à épifluorescence et confocale (*Confocal Olympus Fluoview*) à l'aide d'un microscope inversé (*Olympus IX70*). Les images ont été capturées à l'aide d'une caméra (*Roper Scientific Photometrics*) et traitées avec les logiciels *Image-ProPlus* ou *Fluoview* et *GIMP2*.

1.12 Fractionnement cellulaire

Deux méthodes de fractionnement cellulaire permettant la séparation des diverses parties cellulaires ont été employées. La première méthode a été modifiée de celle publiée par Brissette et Russel (1990). Elle a permis de récupérer les protéines périplasmiques, cytoplasmiques et membranaires des cellules. Pour cette étude, cette méthode a été nommée BR. Des cultures de 16 h des souches contenant ou non les plasmides pDgcK, pDgcL ou pMex07 ont été diluées 1:100 dans 50 mL de milieu avec Ap contenant 0,2 % d'arabinose et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,6. Les cultures ont ensuite été séparées en deux. Vingt-cinq mL de l'une d'elle a servi de contrôle (C) dans lequel il n'y a eu aucun ajout de lysozyme. Les cultures ont été centrifugées 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C. Le culot a été resuspendu avec 1 mL d'une solution froide de Tris-acétate 10 mM à pH 7,8 et contenant 0,75 M de sucrose. Cent µg/mL de lysozyme ont été ajoutés à la suspension. Après une incubation de 2 min dans la glace, la suspension a été diluée avec 2 volumes d'une solution d'EDTA 1,5 mM (*Ethylenediaminetetraacetic acid*) froide ajoutés sous la surface. La suspension a ensuite

été diluée dans $\frac{3}{4}$ du volume initial de la culture, soit 25 mL, avec du milieu LB contenant 0,25 M de sucrose. Après une centrifugation de 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C, le surnageant a été précipité avec un volume égal d'acide trichloroacétique 5 % (TCA 5 %), incubé 5 min à -20 °C et 15 min à 4 °C, et centrifugé 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C. Le culot a enfin été resuspendu avec 200 µL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines présentes dans le périplasme des cellules. Le culot obtenu avant la précipitation au TCA 5 % a été resuspendu avec 5 mL de tampon de choc osmotique (10 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM d'EDTA, 100 mM de NaCl, 20 % de sucrose et 0,4 mg/mL de lysozyme). Deux cycles de gel dans de l'azote liquide et de dégel ont été effectués. Deux µL de DNase I 1 mg/mL ont été ajoutés. Après une incubation de 20 min à température ambiante, une concentration finale de 4 M d'urée a été ajoutée. Après une centrifugation de 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C, le surnageant a été précipité avec un volume égal d'acide trichloroacétique 5 %, incubé 5 min à -20 °C et 15 min à 4 °C, et centrifugé 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C. Le culot a enfin été resuspendu avec 200 µL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines présentes dans le cytoplasme des cellules. Le culot obtenu avant la précédente précipitation au TCA 5 % a été resuspendu avec 1 mL de TE (200 mM de Tris-HCl à pH 8 et 0,2 mM d'EDTA) et précipité avec un volume égal d'acide trichloroacétique 5 %, incubé 5 min à -20 °C et 15 min à 4 °C, et centrifugé 15 min à $3\,035 \times g$ à 4 °C. Le culot a été resuspendu avec 200 µL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines membranaires des cellules.

La deuxième méthode a été adaptée de celle publiée par Russel et Kazmierczak (1993). Elle a permis de récupérer les protéines périplasmiques et cytoplasmiques conjointement, les protéines de la membrane interne et celles de la membrane externe des cellules. Pour cette étude, cette méthode a été nommée RK. Des cultures des souches contenant ou non les plasmides pDgcK, pDgcL ou pMex07 ont été diluées 1:100 dans du milieu avec Ap contenant 0,2 % d'arabinose et incubées jusqu'à une densité optique à 600 nm de 0,6. Deux cents µL de culture ont été centrifugés 2 min à $16\,873 \times g$. Le culot a été resuspendu avec 25 µL de tampon TE (200 mM de Tris-HCl à pH 8,0 et 2 mM d'EDTA). Trente µL de sucrose 40 % et 1 µL de lysozyme 10 mg/mL ont été ajoutés. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 2 cycles de gel dans de l'azote liquide et de dégel ont été effectués. Quatre cents µL

d'eau, 12 μL de MgCl_2 1M et 2 μL de DNase I 1 mg/mL ont été ajoutés. Après une incubation de 20 min à température ambiante, les suspensions ont été centrifugées 5 min à $16\,873 \times g$. Le surnageant a été précipité avec un volume égal d'acide trichloroacétique 10 % (TCA 10 %), incubé 5 min à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ et 15 min à $4\text{ }^\circ\text{C}$, et centrifugé 5 min à $16\,873 \times g$. Le culot a enfin été resuspendu avec 100 μL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines présentes conjointement dans le périplasme et le cytoplasme des cellules. Le culot obtenu avant la précipitation au TCA 10 % a été resuspendu avec 100 μL de tampon contenant 1 % de Triton X-100, 10 mM de MgCl_2 , 50 mM de Tris-HCl à pH 8,0, 1 mM de DTT et 0,1 mM de PMSF, incubé 20 min à $37\text{ }^\circ\text{C}$ et centrifugé 5 min à $16\,873 \times g$. Le surnageant a été précipité avec 100 μL de chloroforme et 240 μL de méthanol, centrifugé 5 min à $16\,873 \times g$ et le culot a été resuspendu avec 100 μL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines de la membrane interne des cellules. Le culot obtenu lors de la dernière centrifugation de 5 min à $16\,873 \times g$ a été resuspendu avec 100 μL de tampon contenant 1 % de Triton X-100, 10 mM d'EDTA, 50 mM de Tris-HCl à pH 8,0, 1 mM de DTT et 0,1 mM de PMSF, incubé 20 min à $37\text{ }^\circ\text{C}$ et centrifugé 5 min à $16\,873 \times g$. Le surnageant a été précipité avec 100 μL de chloroforme et 240 μL de méthanol, centrifugé 5 min à $16\,873 \times g$ et le culot a été resuspendu avec 100 μL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines de la membrane externe des cellules. Le culot restant a été resuspendu avec 100 μL de SDS 4 %. Cette suspension contenait les protéines ne pouvant pas être extraites des cellules.

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1 Régulation de l'expression des gènes *dgcK* et *dgcL*

Les conditions expérimentales optimales qui permettent l'expression des gènes *dgcK* et *dgcL* ont été déterminées via une fusion transcriptionnelle de leur promoteur avec le gène *lacZ* qui code pour la β -galactosidase. Les fusions ont été réalisées chez *E. coli* CAG18439 contenant ICEV_{chMex1} $\Delta dgcK::FRT$ ou $\Delta dgcL::FRT$. Les ICE contenant les fusions *lacZ* ont été transférés par conjugaison vers *V. cholerae* N16961 *lac*⁻, une souche *lacZ*- dérivée de l'isolat clinique N16961 pour donner DA114 et DA118 (Tableau 1). La souche DA142 a été utilisée comme contrôle négatif. Le milieu de base LB, fait en laboratoire, a été utilisé pour les tests. Des températures de croissance de 30, 37 et 42 °C ont d'abord été testées pour déterminer l'influence de la température et de la phase de croissance sur l'activité des promoteurs *PdgcK* et *PdgcL*. L'ajout de 0,04 % de sels biliaires et de 0,1 % de Triton X-100 dans le milieu de croissance à 37 °C a ensuite été testé pour déterminer l'effet de ces détergents (stress membranaire) sur l'activité de ces promoteurs. La courbe de croissance, le taux de survie et l'activité β -galactosidase sont représentés sur les graphiques pour chacune des conditions testées. Des analyses statistiques devront toutefois être réalisées ultérieurement sur les données obtenues.

2.1.1 Contrôles négatifs pour la régulation de l'expression

Un contrôle négatif pour chacune des différentes conditions d'expression a été réalisé. Les valeurs d'activité β -galactosidase obtenues représentées sur les graphiques de la figure 12 sont considérées comme nulles. Les résultats obtenus sont en accord avec ce qui était attendu puisque la souche contrôle possède un gène *lacZ* inactivé qui ne code plus pour une β -

galactosidase fonctionnelle. La faible activité observée peut résulter d'un biais de mesure puisque les valeurs de D.O. sont nettement en-dessous de celles considérées comme significatives.

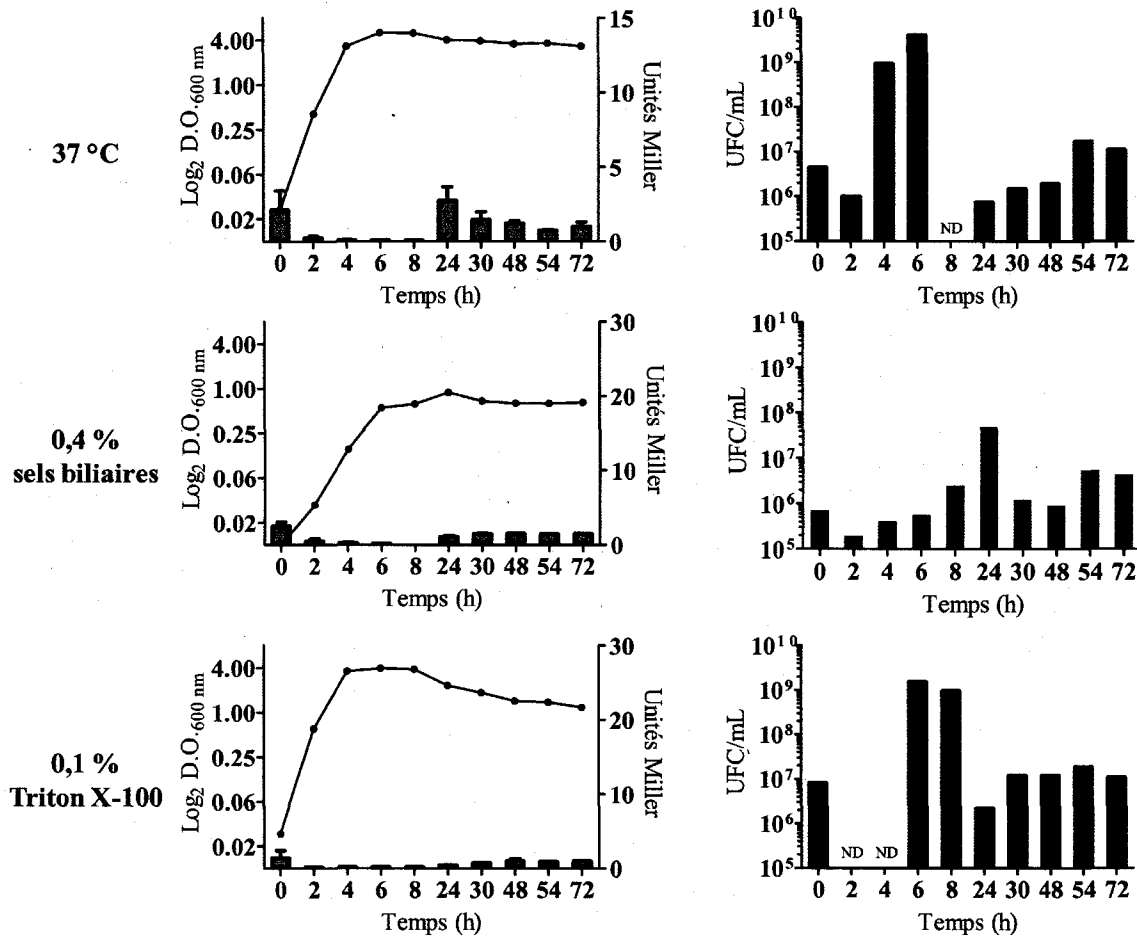


Figure 12 : Expression du contrôle négatif à 37 °C et en présence de 0,04 % de sels biliaires et 0,1 % de Triton X-100.

Sur la colonne de gauche, la courbe indique la croissance telle que mesurée par la D.O. à 600 nm. Les barres grises représentent l'activité β -galactosidase du promoteur calculée en Unités Miller. Les données représentent la moyenne de 3 échantillons prélevés à chaque temps pour une seule expérience. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). Sur la colonne de droite, les barres noires représentent le taux de survie des cellules en culture en UFC/mL. Les données représentent la valeur d'un seul échantillon prélevé à chaque temps pour une seule expérience. ND, non disponible.

2.1.2 Activité du promoteur *PdgcK* en fonction du temps et de la température de croissance

Les courbes de croissance représentées sur les graphiques de gauche à la figure 13 sont similaires bien que la phase exponentielle de croissance commence plus tôt à 37 et 42 °C. L'activité β -galactosidase indique une augmentation de l'expression de *PdgcK* qui débute en phase stationnaire à 30 et 37 °C. Cependant, à partir de 6 h d'incubation et ce jusqu'à 48 h, l'activité de *PdgcK* en phase stationnaire est plus élevée à 37 qu'à 30 °C. L'activité du promoteur déterminée à 2, 4, 6 et 8 h à 42 °C est également similaire à celle obtenue pour les mêmes temps de croissance à 37 °C. Sur les graphiques de gauche (Figure 13), il est possible d'observer une activité au temps 0 et ensuite une répression de l'expression entre 0 et 2 h. L'activité β -galactosidase obtenue au temps 0 représente l'état physiologique des cellules de la culture mère de 16 h ayant servi à l'inoculation. Le taux de survie de la population bactérienne sur les graphiques de droite (Figure 13) confirme l'atteinte de la phase stationnaire plus rapidement à 37 et 42 qu'à 30 °C. Il indique également une population bactérienne plus élevée à 37 et 42 qu'à 30 °C. Les données à 8 et 24 h d'incubation à 30 °C n'ont pu être représentées car les dilutions étalées pour le dénombrement bactérien étaient trop faibles. Le nombre de colonies était trop élevé pour être dénombré. L'expérience à 42 °C a été arrêtée après 8 h d'incubation car le décompte bactérien des cultures non diluées était nul aux temps 24 et 30 h.

2.1.3 Activité du promoteur *PdgcK* dans différentes conditions de croissance

La courbe de croissance obtenue en présence de 0,4 % de sels biliars (Figure 14) ne suit pas la même tendance que celle observée sur le graphique à 37 °C (Figure 13). Il est possible de constater un effet négatif des sels biliars sur le taux de survie des bactéries. Une diminution de plus de 3 log est observée à 4 h. Malgré une croissance plus difficile de la culture bactérienne dans cette condition, l'activité du promoteur *PdgcK* n'est pas plus élevée que celle obtenue à 37 °C (Figure 13) et semble être limitée à la phase stationnaire.

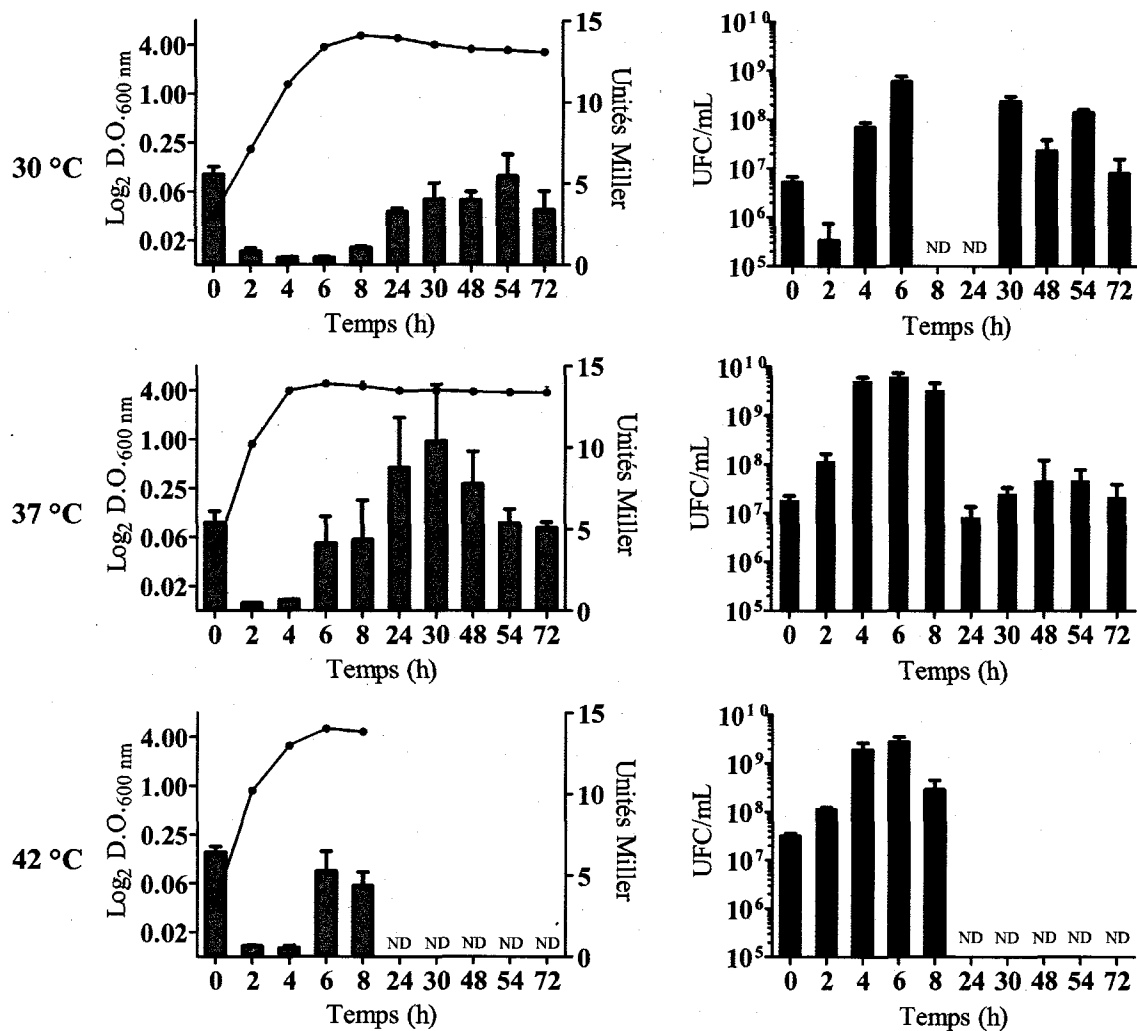


Figure 13 : Activité du promoteur *PdgkK* à 30, 37 et 42 °C.

Sur la colonne de gauche, la courbe indique la croissance telle que mesurée par la D.O. à 600 nm. Les barres grises représentent l'activité β -galactosidase du promoteur calculée en Unités Miller. Les données représentent la moyenne de 3 échantillons prélevés à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Sur la colonne de droite, les barres noires représentent le taux de survie des cellules en culture en UFC/mL. Les données représentent la moyenne d'un seul échantillon prélevé à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). ND, non disponible.

Les données à 2 et 6 h sur le graphique du taux de survie en présence de 0,4 % de sels biliaries n'ont pu être représentées car les dilutions étalées pour le dénombrement bactérien étaient trop faibles. Le nombre de colonies était trop élevé pour être dénombré.

La courbe de croissance obtenue en présence de 0,1 % de Triton X-100 (Figure 14) suit la même tendance que celle observée à 37 °C (Figure 13). Le taux de survie en présence de Triton X-100 est cependant plus faible que celui obtenu à 37 °C (Figure 13). La présence de ce composé dans le milieu affecte donc le taux de survie des bactéries mais pas autant que la présence de sels biliaries. L'activité du promoteur *PdgcK* n'est cependant pas due à l'ajout de Triton X-100 dans le milieu mais bien à un effet en fonction de la phase de croissance.

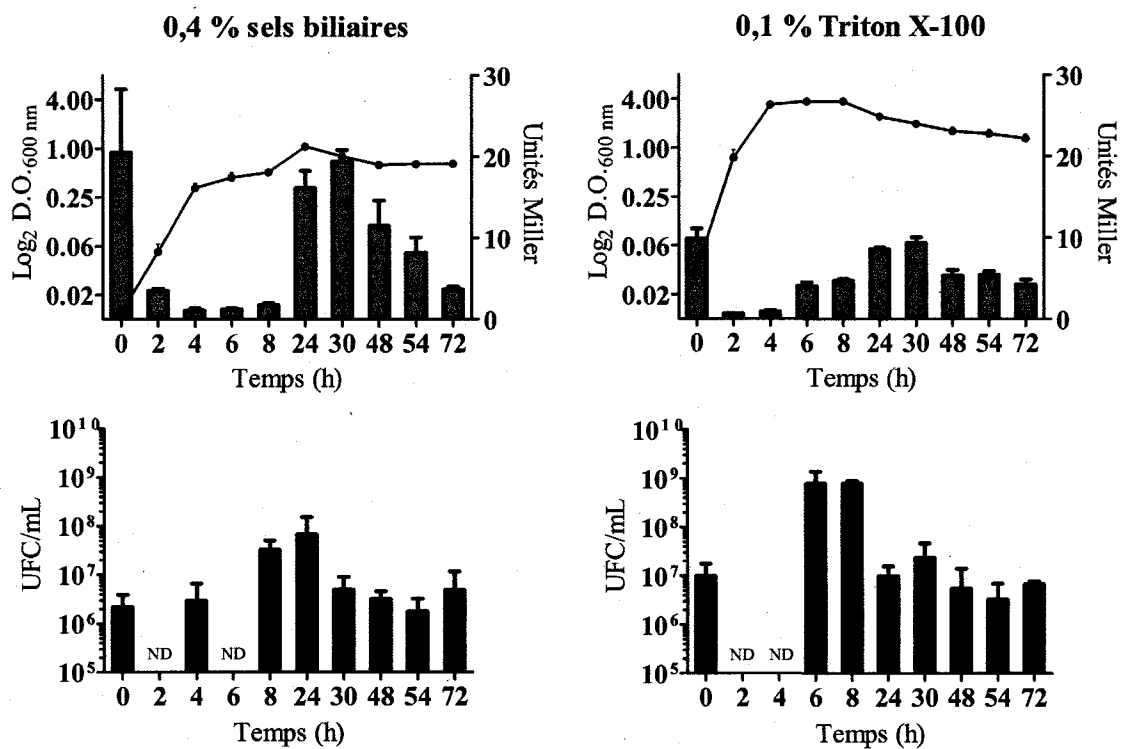


Figure 14 : Activité du promoteur *PdgcK* à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaries et 0,1 % de Triton X-100.

Sur les graphiques du haut, la courbe indique la croissance telle que mesurée par la D.O. à 600 nm. Les barres grises représentent l'activité β -galactosidase du promoteur calculée en Unités Miller. Les données représentent la moyenne de 3 échantillons prélevés à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Sur les graphiques du bas, les barres noires représentent le taux de survie des cellules en culture en UFC/mL. Les données représentent la moyenne d'un seul échantillon prélevé à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). ND, non disponible.

Les profils d'activité de *PdgcK* à 37 °C sans (Figure 13) et avec le Triton X-100 (Figure 14) sont comparables. Les données à 2 et 4 h d'incubation sur le graphique du taux de survie en présence de 0,1 % de Triton X-100 n'ont pu être représentées car les dilutions étalées pour le dénombrement bactérien étaient trop faibles. Le nombre de colonies était trop élevé pour être dénombré.

2.1.4 Activité du promoteur *PdgcL* en fonction du temps et de la température de croissance

Les gènes *dgcL* et *mex07* sont probablement organisés en opéron comme mentionné précédemment. Le promoteur de *dgcL* est en fait celui de *mex07*. Les courbes de croissance et les taux de survie à 30, 37 et 42 °C (Figure 15) sont similaires à ceux observés pour l'activité du promoteur *PdgcK* (Figure 13). L'activité β -galactosidase indique une augmentation de l'expression de *PdgcL* après 24 h à 30 et 37 °C mais plus faible que celle observée chez *PdgcK* et aussi plus en retard par rapport au début de la phase stationnaire (Figure 13). À cette température, l'activité de *PdgcL* est donc similaire en phase stationnaire. L'activité du promoteur déterminée à 2, 4, 6 et 8 h à 42 °C est également similaire à celle obtenue pour les mêmes temps de croissance à 30 et 37 °C (Figure 15). En comparant les graphiques pour *PdgcL* et *PdgcK* à une température de 37 °C, il est également possible d'observer que l'activité de *PdgcK* est stimulée de façon plus précoce par la température mais pas *PdgcL* (Figure 15). Comme observé plus tôt pour *PdgcK* (Figure 13), il y a une activité au point 0 suivie d'une répression de l'expression entre 0 et 2 h de croissance. L'activité β -galactosidase au temps 0 représente également l'état physiologique des cellules de la culture mère de 16 h ayant servi à l'inoculation.

2.1.5 Activité du promoteur *PdgcL* dans différentes conditions de croissance

La courbe de croissance obtenue en présence de 0,4 % de sels biliaires (Figure 16) ne suit pas la même tendance que celle observée à 37 °C (Figure 15).

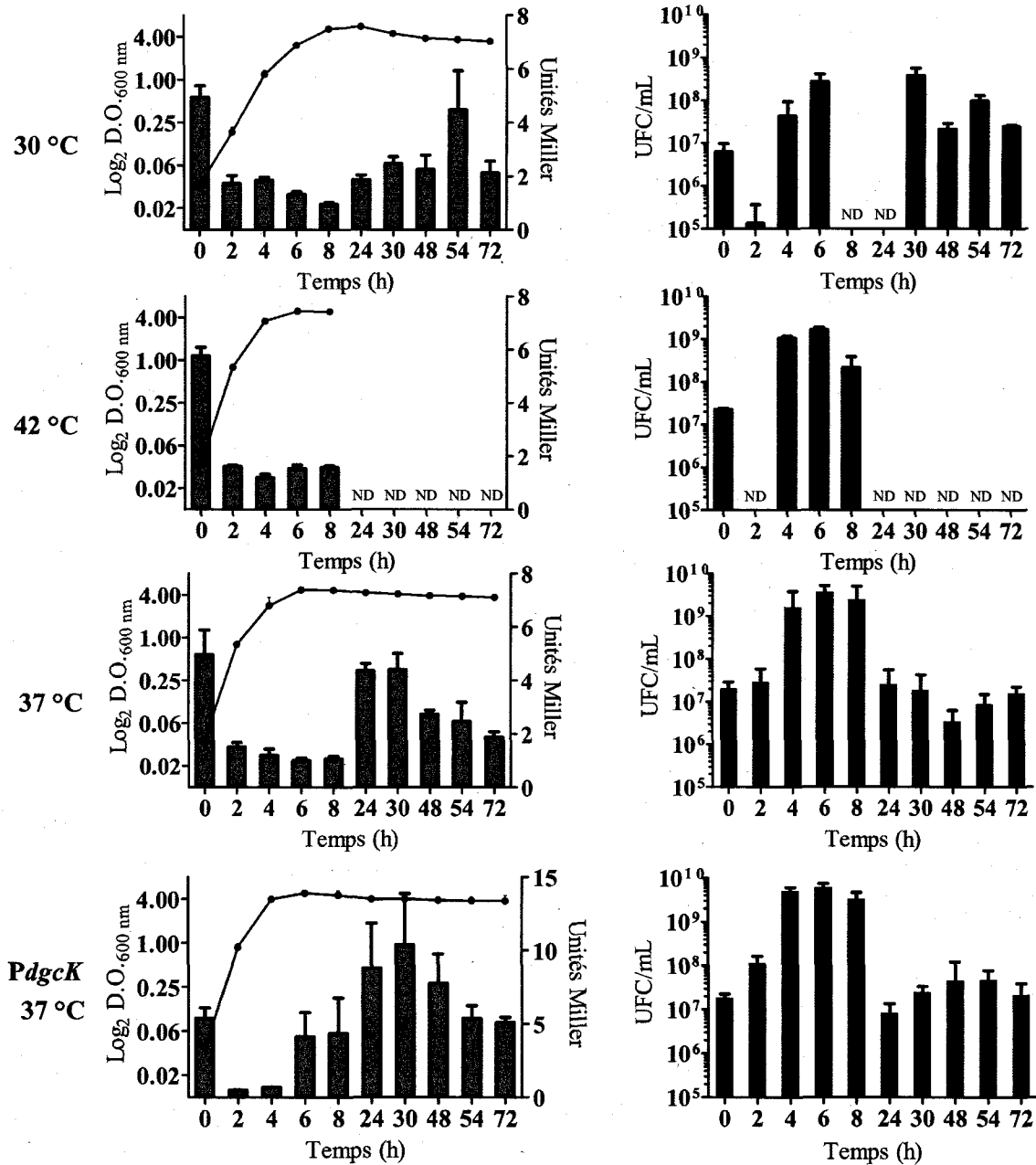


Figure 15 : Activité du promoteur *Pdgcl* à 30, 37 et 42 °C et *PdgkK* à 37 °C.

Sur la colonne de gauche, la courbe indique la croissance telle que mesurée par la D.O. à 600 nm. Les barres grises représentent l'activité β -galactosidase du promoteur calculée en Unités Miller. Les données représentent la moyenne de 3 échantillons prélevés à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Sur la colonne de droite, les barres noires représentent le taux de survie des cellules en culture en UFC/mL. Les données représentent la moyenne d'un seul échantillon prélevé à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). ND, non disponible.

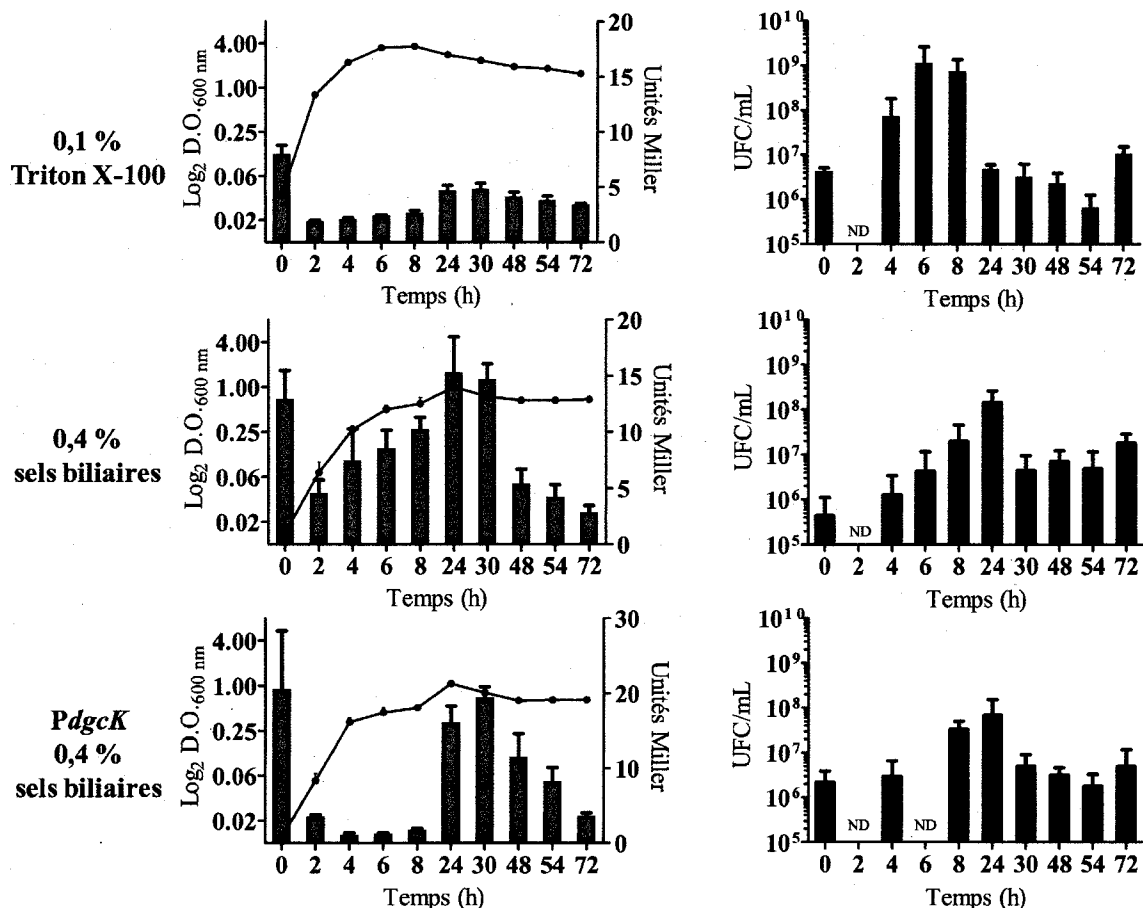


Figure 16 : Activité du promoteur *PdgcL* à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaries et 0,1 % de Triton X-100 et *PdgcK* à 37 °C en présence de 0,4 % de sels biliaries. Sur la colonne de gauche, la courbe indique la croissance telle que mesurée par la D.O. à 600 nm. Les barres grises représentent l'activité β -galactosidase du promoteur calculée en Unités Miller. Les données représentent la moyenne de 3 échantillons prélevés à chaque temps pour 3 expériences indépendantes. Sur la colonne de droite, les barres noires représentent le taux de survie des cellules en culture en UFC/mL. Les données représentent la moyenne d'un seul échantillon prélevé à chaque temps pour 3 expériences indépendantes, à l'exception des valeurs à 54 h en présence de 0,4 % de sels biliaries où il s'agit de 2 expériences indépendantes pour *PdgcL*. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD). ND, non disponible.

Il est possible de constater un effet négatif des sels biliaries sur le taux de survie des bactéries. Malgré une croissance plus difficile de la culture bactérienne dans cette condition, l'activité de *PdgcL* est beaucoup plus élevée que celle obtenue à 37 °C (Figure 15) et aussi beaucoup plus précoce que celle mesurée pour *PdgcK* (Figure 16). La courbe de croissance, le taux de survie

et les valeurs en Unités Miller obtenus en présence de 0,1 % de Triton X-100 (Figure 16) sont comparables à ceux observés à 37 °C (Figure 15). L'activité du promoteur *PdgcL* n'est donc pas modulée par la présence de Triton X-100. La donnée à 2 h sur le graphique du taux de survie en présence de Triton X-100 n'a pu être représentée car les dilutions étalées pour le dénombrement bactérien étaient trop faibles. Le nombre de colonies était trop élevé pour être dénombré.

2.2 Localisation intracellulaire des protéines DgcK, DgcL et Mex07

Différentes méthodes de localisation ont été employées pour déterminer où se retrouvent les protéines DgcK, DgcL et Mex07 dans la cellule. Il s'agit de l'utilisation de protéines recombinantes en condition de surexpression visualisées en microscopie à épifluorescence, de la surexpression des protéines détectées en immunofluorescence et de 2 méthodes de fractionnement cellulaire. Les résultats obtenus pour cette section sont préliminaires. Les temps de surexpression ainsi que les méthodes de fixation sur lame des cellules pour la visualisation en microscopie à épifluorescence doivent être approfondies. *V. cholerae* est une bactérie hautement mobile, d'où la difficulté pour la fixation. Les méthodes de fractionnement cellulaires ont été réalisées une seule fois et doivent être optimisées et certains contrôles doivent également être utilisés. Les résultats obtenus ne font donc que suggérer des pistes à suivre, néanmoins très intéressantes.

2.2.1 Localisation intracellulaire à l'aide de la GFPmut3

La protéine fluorescente GFPmut3 a été utilisée pour localiser DgcK et DgcL. La GFPmut3 est un mutant de la protéine fluorescente verte originale GFP (*Green Fluorescent Protein*). La GFPmut3 possède 2 mutations des acides aminés aux positions 65 et 72 où une sérine est mutée pour une glycine et une sérine pour une alanine, respectivement. La GFPmut3 est ainsi plus soluble que le type sauvage du à un meilleur repliement de la protéine. Ceci permet d'éviter la formation de corps d'inclusion. La fluorescence de la protéine est également augmentée par le décalage de son spectre d'absorption (Cormack *et al.*, 1996). La méthode

pour la construction de protéines recombinantes mise au point par Gerlach et ses collègues (2007) nous a permis d'utiliser ce mutant. Cette technique s'est avérée efficace et a permis l'obtention de fusions traductionnelles des gènes *dgcK* et *dgcL* avec celui de la GFPmut3 chez ICEVchMex1 chez la souche *E. coli* CAG18439. Les fusions ont été amplifiées et clonées dans un vecteur d'expression commercial inductible à l'arabinose pBADTOPO. Le gène *gfpmut3* a également été amplifié et cloné dans ce même vecteur comme contrôle positif pour s'assurer que la protéine GFPmut3 est fonctionnelle. Les vecteurs ont ensuite été électroporés chez *V. cholerae* N16961. Les cultures ont été incubées dans du LB à 37 °C et les plasmides induits avec 0,2 % d'arabinose pendant 1 h. La membrane des cellules a été colorée avec un marqueur lipophile FM4-64 qui a une fluorescence rouge. L'ADN est marqué au DAPI et a une fluorescence bleue. Cette dernière indique la viabilité des cellules. Les images ont été visualisées en microscopie à épifluorescence avec différents filtres pour chaque longueur d'onde utilisée. Les images captées ont ensuite été superposées à l'aide du logiciel *Image-ProPlus*. Seulement une partie de l'échantillon fixé sur la lame a été captée par la caméra en microscopie à épifluorescence. À partir de l'image obtenue, il est possible de ne sélectionner encore qu'une partie puisque la quantité de cellules dans l'échantillon est très grande. C'est ce que représente l'appellation « champ » pour cette section. L'utilisation de protéines recombinantes avec la GFPmut3 a été envisagée pour être en mesure de visualiser le mouvement intracellulaire des protéines dans des conditions de surexpression, soit les protéines clonées sur un vecteur, ou à l'aide de la fusion chromosomique chez ICEVchMex1.

2.2.1.1 Contrôle positif de la GFPmut3

La GFPmut3 surexprimée est fonctionnelle puisqu'elle est distribuée également dans le cytoplasme de la cellule (Figure 17). Une protéine jugée non fonctionnelle aurait été séquestrée en amas et la fluorescence ne serait pas uniforme ou absente.

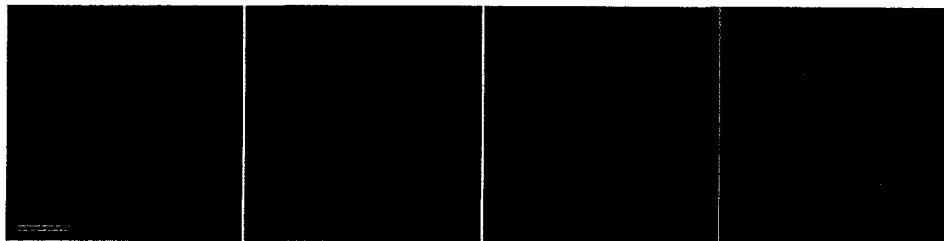


Figure 17 : La GFPmut3 est présente partout dans le cytoplasme.

La membrane est marquée au FM4-64 (rouge), l'ADN au DAPI (bleu) et la protéine GFPmut3 a une fluorescence verte. L'image de droite représente la superposition des images de la membrane et de la GFPmut3. Barre, 1 μ m.

2.2.1.2 Localisation de la protéine recombinante DgcK::GFPmut3

La figure 18 représente un champ de l'image captée en microscopie à épifluorescence. Une majorité des cellules ne semble pas exprimer la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 qui est pourtant en condition de surexpression. Ceci peut être dû au mécanisme d'activation du promoteur P_{BAD} du vecteur et de l'expression qui fonctionne comme un interrupteur *On* ou *Off* (Khlebnikov *et al.*, 2001). Il est possible d'observer que la fluorescence verte chez certaines cellules est diffuse partout dans le cytoplasme tandis que chez deux autres, elle forme un point précis à un pôle cellulaire. La présence uniforme de la protéine recombinante dans le cytoplasme peut indiquer qu'elle a été produite mais qu'elle n'est pas encore localisée. Le temps d'induction de 1 h est relativement court. Les plasmides de certaines cellules, par exemple chez celles nouvellement divisées, ont pu être induits au moment où le temps de l'induction arrivait à sa fin. La protéine exprimée n'aura donc pas eu le temps d'initier son mouvement de localisation. Cette expérience de localisation a toutefois été répétée plusieurs fois et ce, en améliorant les conditions de fixation des cellules sur la lame. La localisation a toujours été observée comme étant au pôle cellulaire chez *V. cholerae* (résultats non montrés).

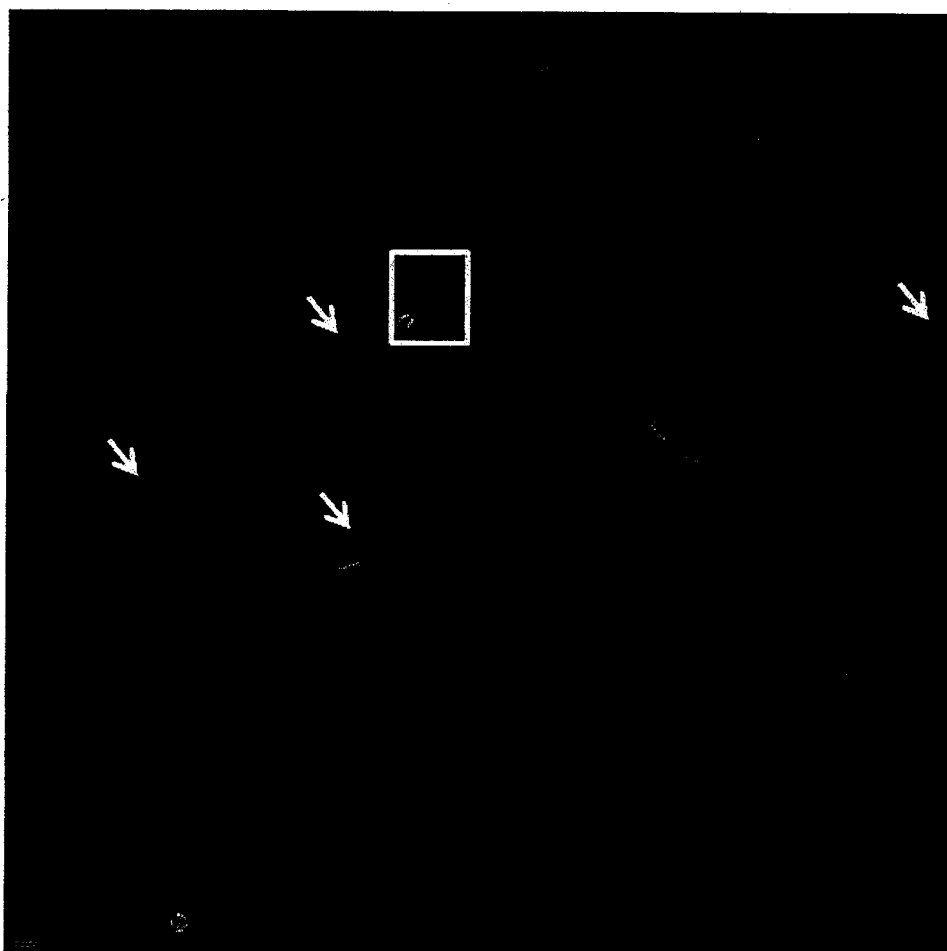


Figure 18 : Champ de la localisation intracellulaire de la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.

Superposition d'images captées à l'aide des différents filtres de fluorescence où la membrane est colorée au FM4-64 (rouge), l'ADN au DAPI (bleu) et la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 a une fluorescence verte. La cellule encadrée est représentée à la figure 19. Flèches blanches, fluorescence diffuse dans les cellules. Barre, 1 μ m.

La cellule encadrée a été agrandie et est représentée à la figure 19. La présence d'un point de fluorescence bien défini indique clairement que la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 surexprimée pourrait se localiser à un pôle cellulaire chez cette cellule.

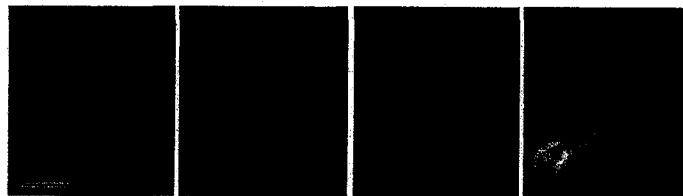


Figure 19 : DgcK::GFPmut3 se localise à un pôle cellulaire en microscopie à épifluorescence. La membrane est colorée au FM4-64 (rouge), l'ADN au DAPI (bleu) et la protéine recombinante DgcK::GFPmut3 a une fluorescence verte. L'image de droite représente la superposition des images qui la précède et provient de l'encadré de la figure 18. Barre, 1 μ m.

2.2.1.3 Localisation de la protéine recombinante DgcL::GFPmut3

La figure 20 représente un champ de l'image captée en microscopie à épifluorescence. Il est possible d'observer que la majorité des cellules expriment la protéine recombinante DgcL::GFPmut3, représentée par une fluorescence verte sur l'image. La protéine recombinante DgcL::GFPmut3 surexprimée ne se localise pas au même endroit chez toutes les cellules. En effet, elle se retrouve localisée de façon polaire ou subpolaire. Les cellules encadrées ont été agrandies et sont représentées à la figure 21. Il est important de noter qu'il a été émis que les protéines DgcL et Mex07 pourraient interagir ensemble. Cependant, Mex07 est absente dans ce contexte de localisation. Son absence influence donc fort probablement la localisation de DgcL. La présence d'un point de fluorescence bien défini indique toutefois que DgcL est localisé chez la majorité des cellules. Par contre, elle n'est pas séquestrée au même endroit précisément. Il serait intéressant de localiser conjointement DgcL et Mex07 pour déterminer si elles colocalisent et si leur localisation est affectée, dans le temps, par la présence de l'une ou l'autre d'entre elles.

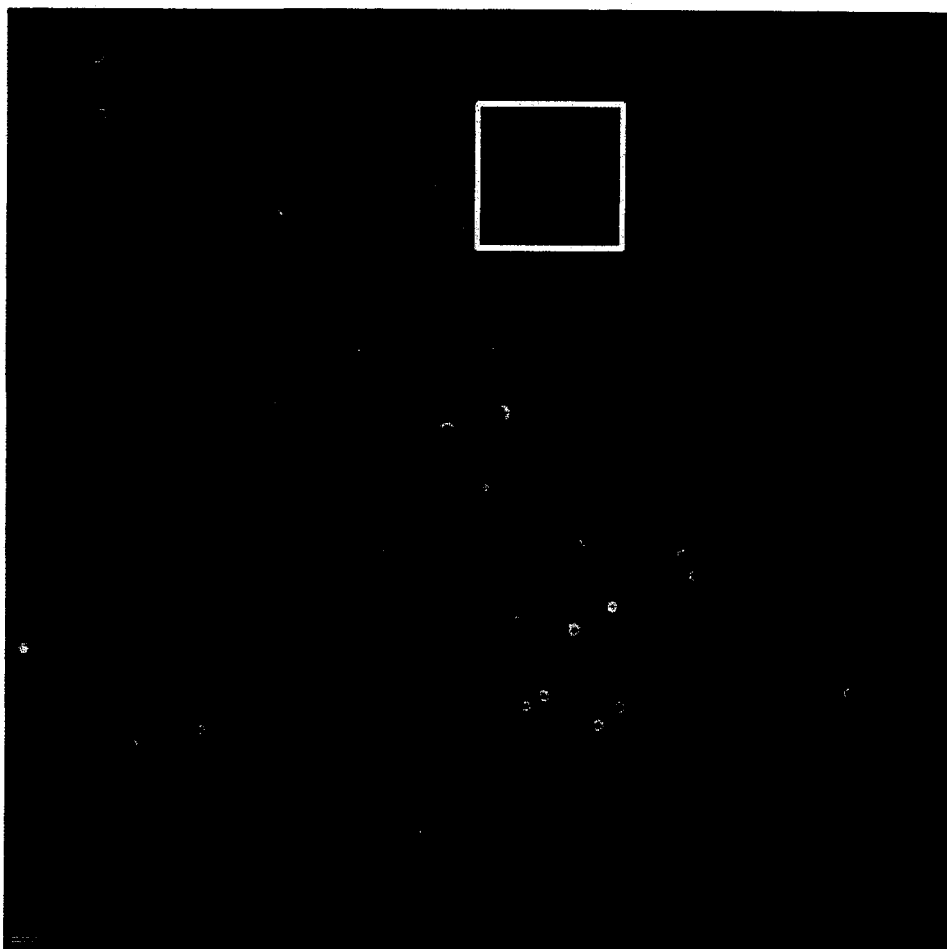


Figure 20 : Champ de la localisation intracellulaire de la protéine recombinante DgcL::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.

Superposition d'images captées à l'aide des différents filtres de fluorescence où la membrane est colorée au FM4-64 (rouge), l'ADN au DAPI (bleu) et la protéine recombinante DgcL::GFPmut3 a une fluorescence verte. Les cellules encadrées sont représentées à la figure 21. Barre, 1 μ m.

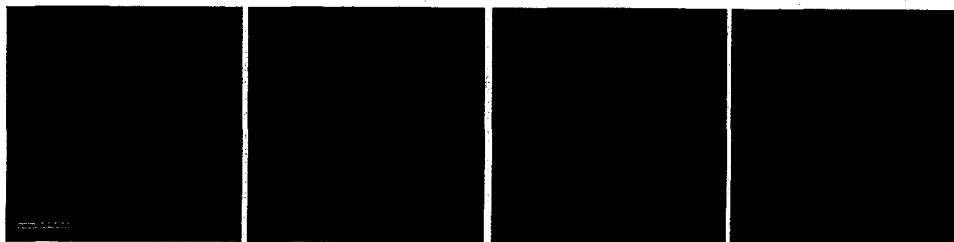


Figure 21 : Localisation variable de DgcL::GFPmut3 en microscopie à épifluorescence.

La membrane est colorée au FM4-64 (rouge), l'ADN au DAPI (bleu) et la protéine recombinante DgcL::GFPmut3 a une fluorescence verte. L'image de droite représente la superposition des images qui la précède et provient de l'encadré de la figure 20. Barre, 1 μ m.

2.2.2 Localisation intracellulaire par immunofluorescence

Les protéines DgcK, DgcL et Mex07 ont été localisées à l'aide de la détection par des anticorps (immunofluorescence). Ces anticorps spécifiques contre chacune de ces protéines ont été produits par un processus de vaccination animale. Ces anticorps doivent être caractérisés pour ensuite être utilisés lors d'essais de localisation en microscopie à épifluorescence. Cette deuxième méthode de localisation sert à confirmer les résultats obtenus lors de la localisation des protéines recombinantes avec la GFPmut3. Cette méthode sert à localiser les protéines en condition de surexpression, comme présenté dans cette étude, ou lorsque les protéines sont exprimées à partir d'ICEV*ch*Mex1. Les protéines DgcK, DgcL et Mex07 ont été surexprimées à l'aide du vecteur pBAD24 chez *V. cholerae* N16961 pendant 1 h avec 0,2 % d'arabinose. L'ADN est également marqué au DAPI. Les images ont été visualisées en microscopie à épifluorescence avec différents filtres pour chaque longueur d'onde utilisée. Les images captées ont ensuite été superposées à l'aide du logiciel *Image-ProPlus*. La membrane n'a pas été marquée pour l'immunofluorescence du à l'incompatibilité du colorant FM4-64 avec la méthode de fixation au formaldéhyde. L'utilisation d'un analogue du FM4-64 est toutefois possible. Certains paramètres de cette méthode doivent encore être optimisés dont le protocole pour perméabiliser les cellules. Des précautions particulières doivent être prises concernant l'interprétation de ces images et tenir compte du fait que les anticorps n'ont peut être pas pénétré de façon homogène dans les cellules.

2.2.2.1 Caractérisation d'anticorps en vue d'essais de localisation par microscopie à épifluorescence et par fractionnement cellulaire

2.2.2.1.1 Détermination des titres d'anticorps dirigés contre DgcK, DgcL et Mex07

Les titres d'anticorps dirigés contre les protéines DgcK, DgcL et Mex07 permettent de déterminer l'efficacité de la réponse immunitaire des animaux vaccinés, soit d'affirmer que des anticorps ont bien été produits contre ces protéines. Les titres d'anticorps ont été déterminés par *ELISA* (Figure 22). Les anticorps présents chez les animaux avant la vaccination (pré-immun) ne reconnaissent pas DgcK, DgcL ou Mex07 qui sont les différents antigènes utilisés pour ces *ELISA* (Figure 22A, B et C). Le titre pour les anticorps IgG anti-DgcK a été déterminé à partir du sérum recueilli du sang prélevé après la deuxième vaccination chez le lapin. Il est de 8 000 (Figure 22A). Lors du processus de vaccination, une poule a également été vaccinée dans le but de produire des anticorps IgY contre DgcK (résultats non montrés). Ces anticorps extraits des œufs n'ont cependant pas encore été utilisés lors d'expériences. Il serait intéressant de les utiliser ultérieurement à des fins de colocalisation avec d'autres protéines. Pour DgcL, les anticorps ont été extraits du jaune d'un seul œuf de poule après la troisième vaccination. Il est de 64 000 (Figure 22B). Le titre d'anticorps IgG anti-Mex07 a été déterminé à partir du sérum recueilli du sang prélevé après la deuxième vaccination chez le lapin. Il a été déterminé comme étant de plus de 64 000 (Figure 22C). Les dilutions du sérum n'étaient pas assez élevées pour obtenir un titre plus précis.

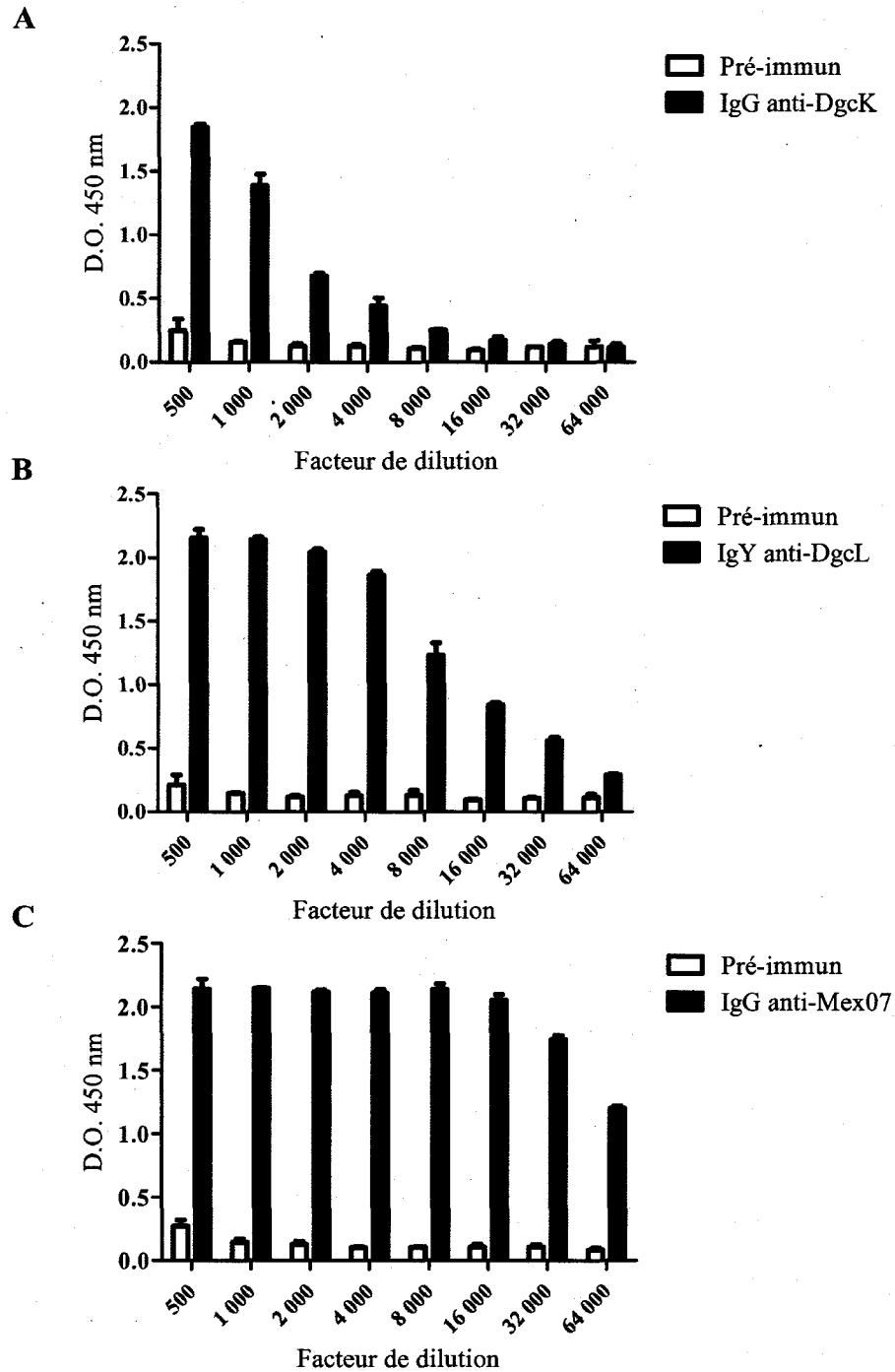


Figure 22 : Détermination des titres d'anticorps.

Les barres blanches représentent les anticorps présents chez l'animal avant la première vaccination (Pré-immun). Les barres noires représentent les anticorps présents après la vaccination à partir desquelles le titre a été déterminé. A. IgG anti-DgcK. B. IgY anti-DgcL. C. IgG anti-Mex07. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard (SD).

2.2.2.1.2 Détermination de la spécificité des anticorps anti-DgcK, anti-DgcL et anti-Mex07 sur des lysats bactériens

Les lysats obtenus à partir de *V. cholerae* N16961 contenant ou non les plasmides pBAD24, pDgcK, pDgcL ou Mex07 (Tableaux 1 et 2) ont été utilisés pour cet essai. Le but était de déterminer la spécificité des anticorps anti-DgcK, anti-DgcL et anti-Mex07 contre leur protéine respective mais aussi contre d'autres protéines de *V. cholerae* N16961. La souche mexicaine d'origine *V. cholerae* 1-010118-075 contenant ICE V_{ch} Mex1 n'a pas été utilisée pour déterminer la spécificité des anticorps dans cette étude car l'accumulation des protéines s'est révélée trop faible dans nos conditions expérimentales. Les différents lysats ont migrés sur des gels SDS-PAGE en conditions dénaturantes qui ont par la suite été colorés au bleu de Coomassie (Figure 23). Ensuite, les lysats bactériens sur les gels ont été transférés sur une membrane par immunobuvardage de type Western et ces dernières, détectées sur film par chimiluminescence.

L'appellation « pré-immun » désigne le premier contrôle négatif effectué. En effet, les membranes représentées aux figures 23A, C et E ont été incubées respectivement avec le sérum pré-immun obtenu avant la vaccination d'un lapin contre la protéine DgcK, avec les anticorps extraits d'un œuf pré-immun obtenu avant la vaccination d'une poule contre DgcL et avec le sérum pré-immun obtenu avant la vaccination d'un lapin contre Mex07. Aucune détection de protéines sur les films n'est observée bien que ces dernières soient présentes en grande quantité comme observé sur les gels SDS-PAGE. Ces résultats indiquent que les anticorps présents dans le sang des animaux avant la vaccination avec DgcK, DgcL ou Mex07, ne reconnaissent pas de protéines de *V. cholerae* N16961 dans ces trois puits, ni spécifiquement leur protéine cible qui est surexprimée chez cette même souche dans le troisième puits.

L'appellation « IgG anti-DgcK » désigne le test de spécificité effectué à l'aide des anticorps spécifiques obtenus suite à la vaccination avec DgcK (Figure 23B).

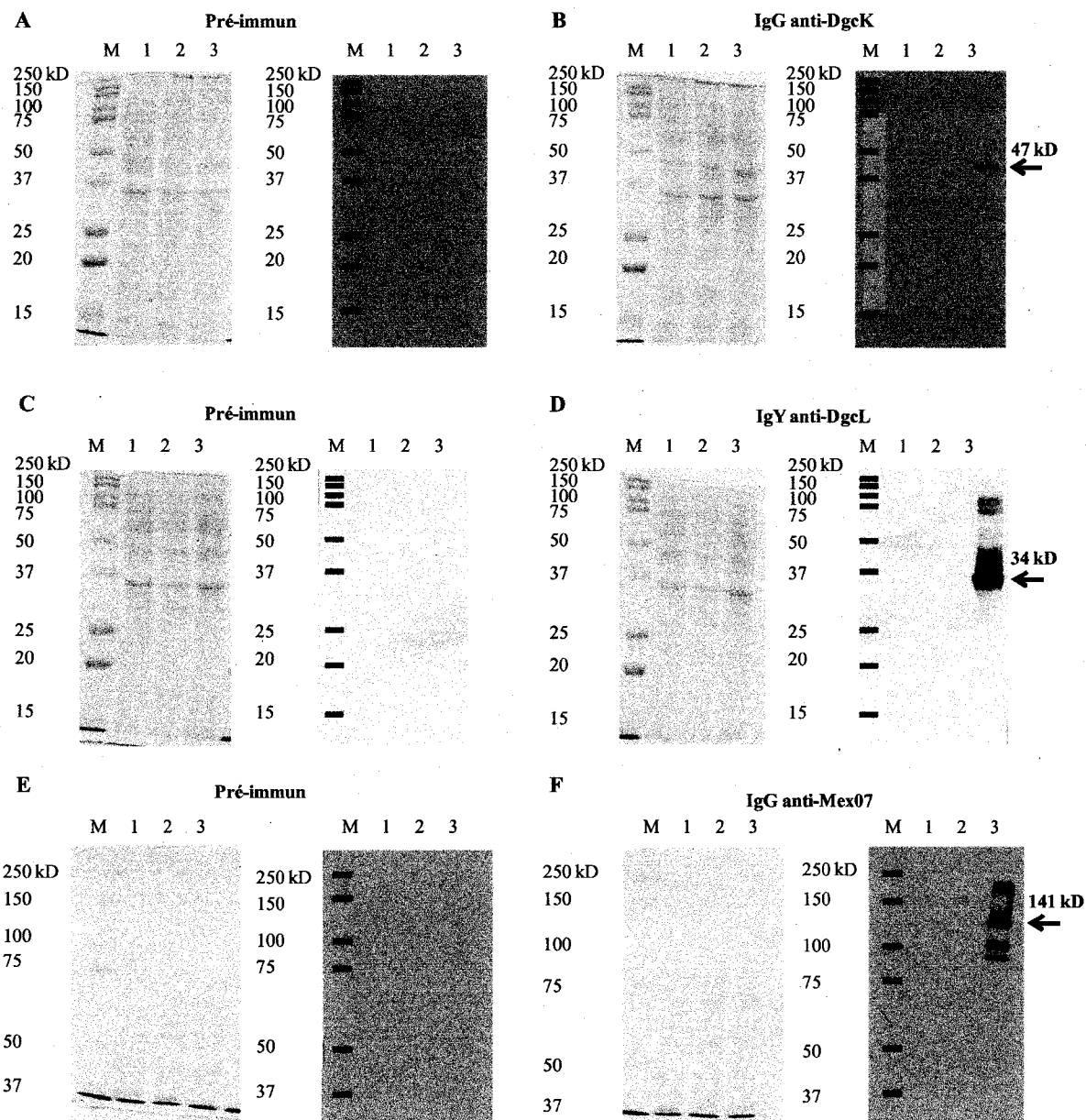


Figure 23 : Test de spécificité des anticorps anti-DgcK, anti-DgcL et anti-Mex07 sur des lysats bactériens.

L'image de gauche sur chaque panneau correspond à la migration des lysats sur gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie. A, C et E. Contrôle négatif effectué avec les anticorps pré-immun. B, D et F. Test de spécificité avec les anticorps obtenus suite à la vaccination animale. Le puits M représente le marqueur kaléidoscope, 1, N16961, 2, N16961 pBAD24 et 3, N16961 pDgcK (B), pDgcL (D) ou pMex07 (F). La dilution des anticorps est de 1/32 000. Le temps d'exposition pour la détection sur le film est de 5 min pour A et B, 30 secondes pour C, D, E et F.

La membrane a été incubée avec le sérum recueilli du sang prélevé chez le lapin après la deuxième vaccination et qui contient les anticorps anti-DgcK. Aucune protéine sur le film n'est détectée dans les puits 1 et 2 qui représentent un second contrôle négatif. Ce résultat indique que les anticorps présents dans le sang du lapin vacciné, y compris ceux spécifiques à DgcK, ne reconnaissent pas de protéines de *V. cholerae* N16961. Par contre, une bande de 47 kD est détectée dans le troisième puits où DgcK est surexprimée chez cette même souche. Ils sont donc spécifiques.

L'appellation « IgY anti-DgcL » désigne le test de spécificité effectué à l'aide des anticorps obtenus suite à la vaccination de la poule avec DgcL (Figure 23D). La membrane a donc été incubée avec les anticorps anti-DgcL extraits d'un œuf obtenu après la troisième vaccination avec DgcL et qui contient les anticorps anti-DgcL. Aucune protéine sur le film n'est détectée dans les puits 1 et 2, qui représentent un second contrôle négatif. Ce résultat indique que les anticorps présents chez la poule vaccinée, y compris ceux spécifiques à DgcL, ne reconnaissent pas de protéines de *V. cholerae* N16961. Par contre, une bande de 34 kD est détectée dans le troisième puits où DgcL est surexprimée chez cette même souche. On observe également l'apparition de 2 bandes de taille plus élevée qui peuvent s'expliquer comme étant différentes formes de la protéine. Comme une dimérisation par exemple car la taille d'une des bandes correspond environ au double du poids de DgcL. Néanmoins, la bande avec la plus forte intensité est de 34 kD, ce qui indique la reconnaissance de la protéine DgcL par ses anticorps spécifiques.

L'appellation « IgG anti-Mex07 » désigne le test de spécificité effectué à l'aide des anticorps obtenus suite à la vaccination du lapin avec Mex07 (Figure 23F). La membrane a été incubée avec le sérum recueilli du sang prélevé après la deuxième vaccination du lapin avec Mex07 et qui contient les anticorps anti-Mex07. Aucune protéine sur le film n'est détectée dans les puits 1 et 2 qui représentent un second contrôle négatif. Ce résultat indique que les anticorps présents dans le sang du lapin vacciné, y compris ceux spécifiques à Mex07, ne reconnaissent pas de protéines de *V. cholerae* N16961. Par contre, une bande de 141 kD est détectée dans le troisième puits. Ce résultat indique la reconnaissance de la protéine Mex07 par ses anticorps

spécifiques IgG produits chez le lapin puisqu'elle était surexprimée dans ce lysat. On observe également l'apparition de 2 bandes de plus petite taille. Ceci suggère que Mex07 a peut-être été clivée car ces bandes apparaissent seulement en présence de Mex07. La protéine a également pu être dégradée.

2.2.2.2 Localisation de la protéine DgcK par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques

Trois différents champs de l'échantillon fixé sur la lame sont représentés en microscopie à épifluorescence pour localiser la protéine DgcK (Figure 24). Les anticorps anti-DgcK démontrés comme étant spécifiques à DgcK (Figure 23A et B) ont été utilisés pour cette localisation.



Figure 24 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine DgcK en immunofluorescence.

Superposition des images captées à l'aide des différents filtres de fluorescence. L'ADN est coloré au DAPI (bleu) et la détection des anticorps IgG anti-DgcK liés à DgcK par les anticorps secondaires anti-IgG est représentée par une fluorescence verte. Barre, 1 μ m.

La cellule encadrée a été agrandie à la figure 25. Les images du haut représentent un contrôle négatif, *V. cholerae* N16961 pBAD24 surexprimé, mis en contact avec les anticorps anti-DgcK. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite en haut, une faible détection de protéines par les anticorps anti-DgcK est observée.

V. cholerae N16961
pBAD24
IgG anti-DgcK

V. cholerae N16961
pDgcK
Pré-immun

V. cholerae N16961
pDgcK
IgG anti-DgcK

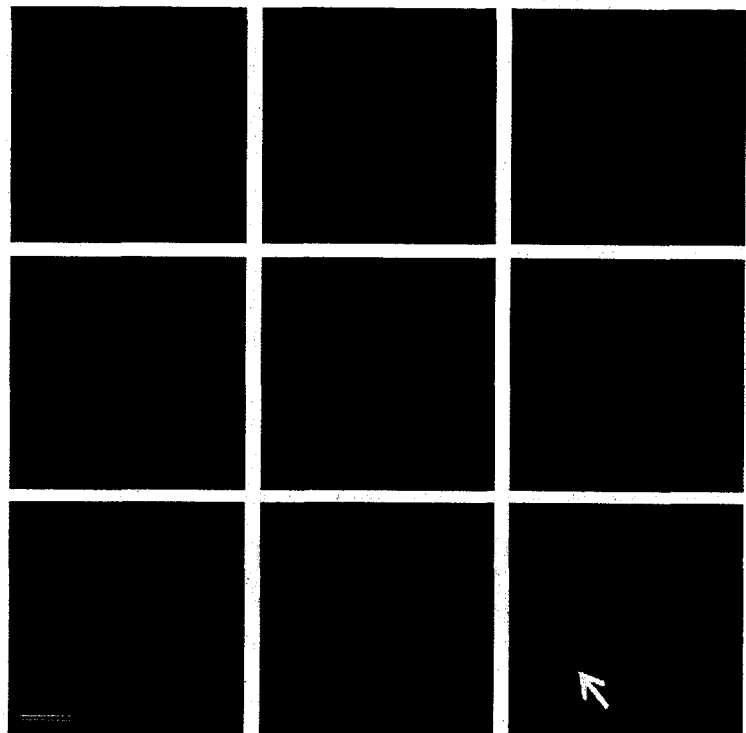


Figure 25 : DgcK se localise à un pôle cellulaire en immunofluorescence.

L'ADN est coloré au DAPI (bleu) sur les images de gauche et la détection des anticorps IgG anti-DgcK liés à DgcK par les anticorps secondaires anti-IgG est représentée par une fluorescence verte sur les images du milieu. Les images de droite représentent la superposition des images qui les précèdent. Flèche blanche, point de fluorescence le plus intense. Barre, 1 μ m.

Cette détection est considérée comme étant non spécifique, car les anticorps sont propres à DgcK. L'augmentation de la dilution des anticorps anti-DgcK pourrait réduire ce bruit de fond car leur spécificité serait augmentée. Les images du milieu représentent également un autre contrôle négatif, *V. cholerae* N16961 pDgcK surexprimé, mis, cette fois, en contact avec les anticorps obtenu du sérum pré-immun. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite au milieu il y a une faible détection de protéines de *V. cholerae* N16961 par les anticorps présents dans le sérum pré-immun. Aucune détection n'était visible pour le test de spécificité (Figure 23A). Encore une fois, augmenter la dilution d'anticorps permettrait d'éliminer le bruit de fond. Les images du bas montrent *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcK et mis en contact avec les anticorps anti-DgcK. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite en bas, il est possible de localiser la protéine DgcK, reconnue

par ses anticorps, à un pôle cellulaire où la fluorescence est plus forte. Il est possible d'observer une organisation en forme de spirale plus marquée chez ces cellules qui devra être confirmée par la microscopie confocale. Le panneau de la figure 26 est composé des images captées en microscopie confocale.

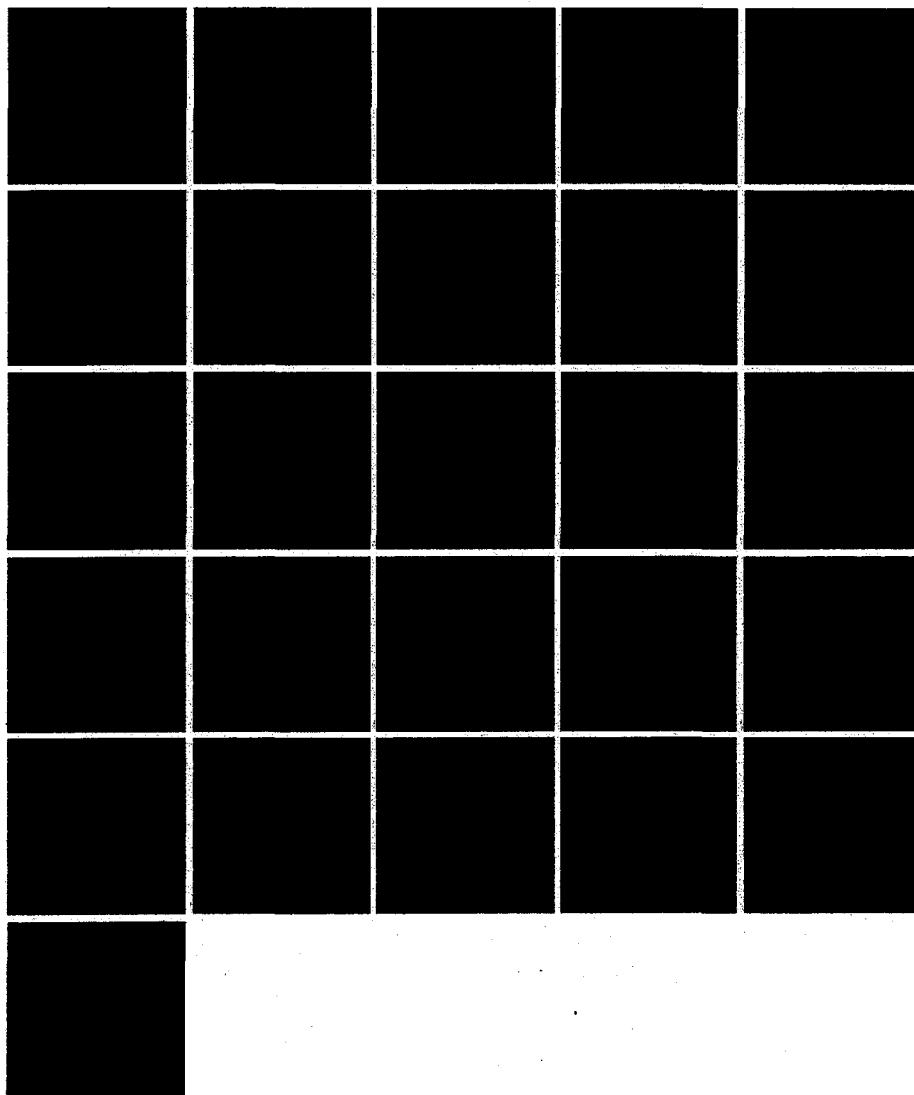


Figure 26 : DgcK se localise à un pôle cellulaire en immunofluorescence avec la microscopie confocale.

La fluorescence verte indique la détection des anticorps IgG anti-DgcK liés à DgcK par les anticorps secondaires anti-IgG. Les différentes images représentent des tranches de 0,1 μm . Barre, 1 μm .

Les différentes images représentent les tranches de l'échantillon analysé d'une épaisseur de 0,1 μm . Il est donc possible d'observer, à ce plus fort grossissement, que la protéine DgcK se localise clairement à un pôle cellulaire car la fluorescence y forme un point marqué. Cependant, on remarque encore plus précisément la structure intracellulaire en forme de spirale de la protéine.

2.2.2.3 Localisation de la protéine DgcL par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques

La figure 27 représente trois différents champs sélectionnés à divers endroits sur la lame observée en microscopie à épifluorescence pour localiser la protéine DgcL. Les anticorps anti-DgcL démontrés comme étant spécifiques à DgcL (Figures 23C et D) ont été employés pour cette méthode. Il est possible d'observer différents points de localisation. Ceci confirme donc que DgcL se localise mais pas toujours au même endroit.



Figure 27 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine DgcL en immunofluorescence.

Cette figure représente la superposition des images captées à l'aide des différents filtres de fluorescence. L'ADN est coloré au DAPI (bleu) et la détection des anticorps IgY anti-DgcL liés à DgcL par les anticorps secondaires anti-IgY est représentée par une fluorescence rouge. Barre, 1 μm .

La cellule encadrée (Figure 27) a été grossie et est représentée à la figure 28. Les images du haut représentent un contrôle négatif, *V. cholerae* N16961 pBAD24, surexprimé et mis en

contact avec les anticorps anti-DgcL. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite en haut, aucune détection de protéines par les anticorps anti-DgcL n'est observée. Ceci confirme que les anticorps sont spécifiques à DgcL et ne reconnaissent pas de protéines de *V. cholerae*. Les images du milieu représentent également un contrôle négatif, *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcL et mis en contact avec les anticorps extraits de l'œuf pré-immun.

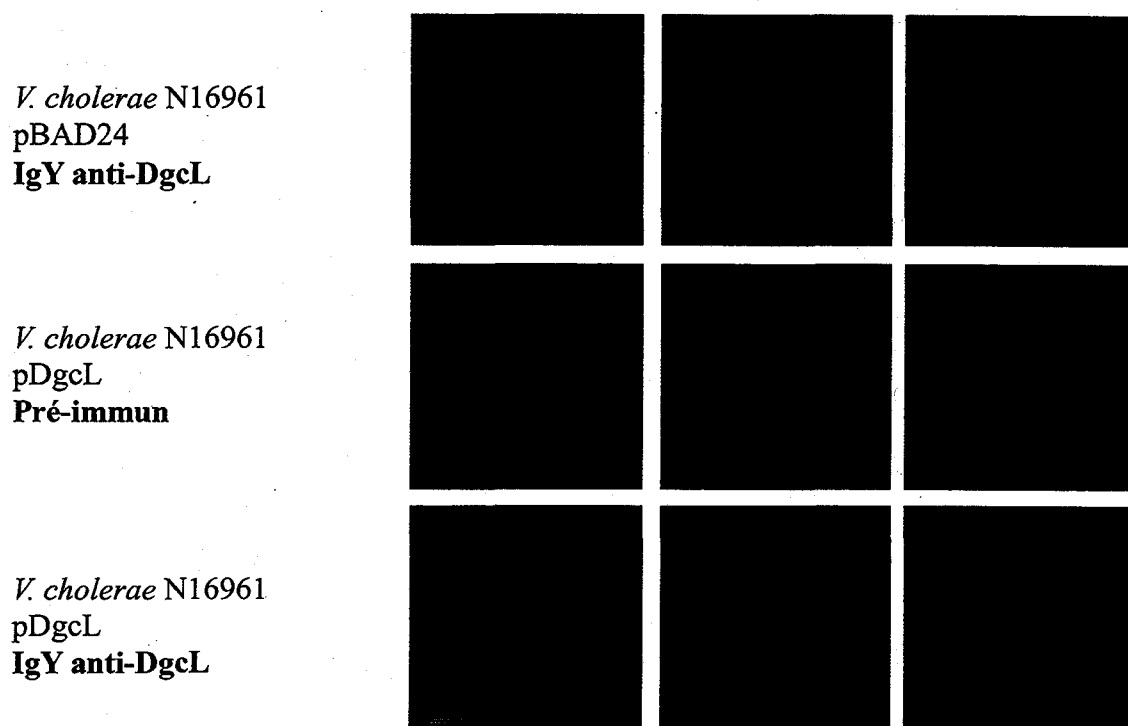


Figure 28 : Localisation variable de DgcL en immunofluorescence.

L'ADN est coloré au DAPI (bleu) sur les images de gauche et la détection des anticorps IgY anti-DgcL liés à DgcL par les anticorps secondaires anti-IgY est représentée par une fluorescence rouge sur les images du milieu. Les images de droite représentent la superposition des images qui les précèdent. Barre, 1 μ m.

Sur la superposition d'images représentée par celle de droite au milieu, aucune détection de protéines de *V. cholerae* N16961 ni même spécifiquement de DgcL, par les anticorps extraits de l'œuf pré-immun n'est observée. Les images du bas représentent *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcL et mis en contact avec les anticorps anti-DgcL. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite en bas, il est possible de localiser la protéine DgcL,

reconnue par ses anticorps, à un pôle cellulaire. Sa localisation varie cependant puisque chez d'autres cellules, DgcL se retrouve localisée également de façon subpolaire (Figures 20, 21 et 27).

Le panneau de la figure 29 est composé des images captées en microscopie confocale représentant différentes tranches d'une épaisseur de 0,1 μm de l'échantillon analysé.

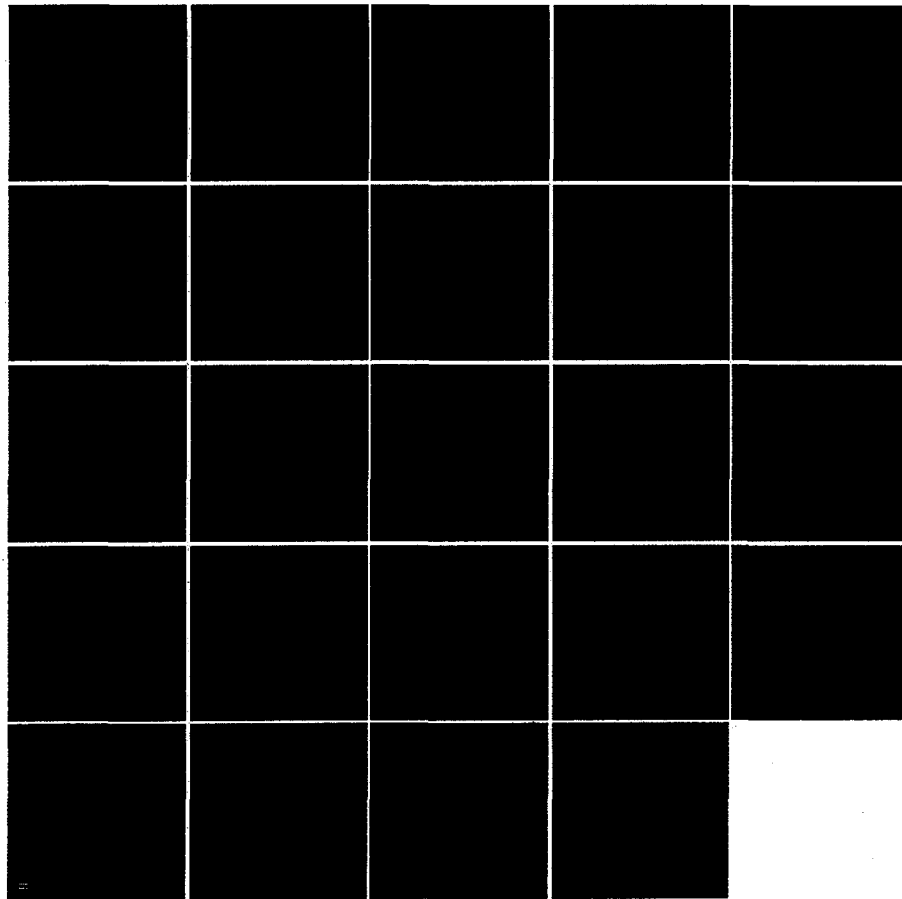


Figure 29 : Localisation variable de DgcL en immunofluorescence avec la microscopie confocale. La fluorescence rouge indique la détection des anticorps IgY anti-DgcL liés à DgcL par les anticorps secondaires anti-IgY. Les différentes images représentent des tranches de 0,1 μm . Barre, 1 μm .

Il est donc possible d'observer, à ce plus fort grossissement, une fluorescence plus marquée à un pôle. Cependant, on note également que la protéine DgcL est dispersée dans la cellule. Encore une fois, l'absence de Mex07 dans ce contexte peut influencer sa localisation.

2.2.2.4 Localisation de la protéine Mex07 par microscopie à épifluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques

La figure 30 représente trois différents champs de l'échantillon fixé sur la lame observée en microscopie à épifluorescence pour localiser la protéine Mex07. Les anticorps anti-Mex07 démontrés comme étant spécifiques à Mex07 (Figure 23C et D) ont été employés pour cette méthode. Il est possible d'observer une fluorescence diffuse et parfois plus marquée aux pôles cellulaires.



Figure 30 : Champs de l'échantillon pour la localisation intracellulaire de la protéine Mex07 en immunofluorescence.

Cette figure représente la superposition des images captées à l'aide des différents filtres de fluorescence. L'ADN est coloré au DAPI (bleu) et la détection des anticorps IgG anti-Mex07 liés à Mex07 par les anticorps secondaires anti-IgG est représentée par une fluorescence verte. Barre, 1 μ m.

La cellule encadrée a été grossie et est représentée à la figure 31. Les images du haut représentent un contrôle négatif *V. cholerae* N16961 pBAD24 surexprimé et mis en contact avec les anticorps anti-Mex07. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite en haut, aucune détection de protéines par les anticorps anti-Mex07 n'est observée. Ce qui

confirme également la spécificité des anticorps anti-Mex07. Les images du milieu représentent aussi un contrôle négatif qui est *V. cholerae* N16961 surexprimant Mex07 et mis en contact avec les anticorps obtenu du sérum pré-immun. Sur la superposition d'images représentée par celle de droite au milieu, aucune détection de protéines de *V. cholerae* N16961 ni même spécifiquement de Mex07, par les anticorps présents dans le sérum pré-immun n'est observée.

V. cholerae N16961
pBAD24
IgG anti-Mex07

V. cholerae N16961
pMex07
Pré-immun

V. cholerae N16961
pMex07
IgG anti-Mex07

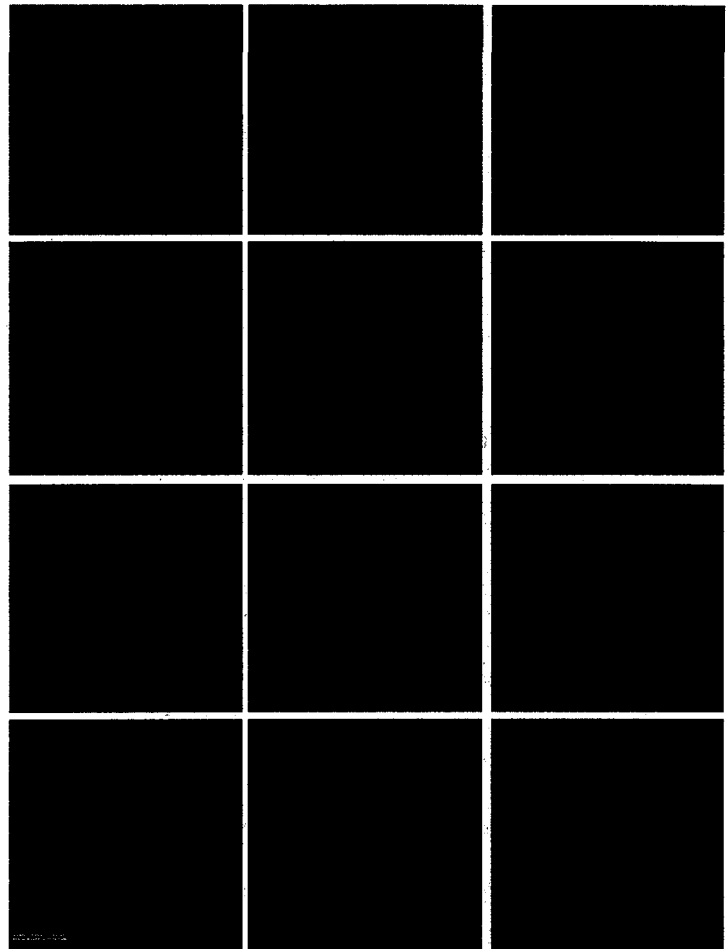


Figure 31 : Mex07 se localise de façon diffuse en immunofluorescence.

L'ADN est coloré au DAPI (bleu) sur les images de gauche et la détection des anticorps IgG anti-Mex07 liés à Mex07 par les anticorps secondaires anti-IgG est représentée par une fluorescence verte sur les images du milieu. Les images de droite représentent la superposition des images qui les précèdent. Barre, 1 μ m.

Les images du bas représentent *V. cholerae* N16961 surexprimant Mex07 et mis en contact avec les anticorps anti-Mex07. Sur la superposition d'images représentée par celles de droite en bas, il est possible d'observer la protéine Mex07, reconnue par ses anticorps, qui se localise de façon plus diffuse mais également aux pôles cellulaires.

Le panneau de la figure 32 est composé des images captées en microscopie confocale représentant différentes tranches d'une épaisseur de 0,1 μm de l'échantillon analysé. Il est possible d'observer que Mex07 se localise de façon plutôt diffuse dans la cellule.

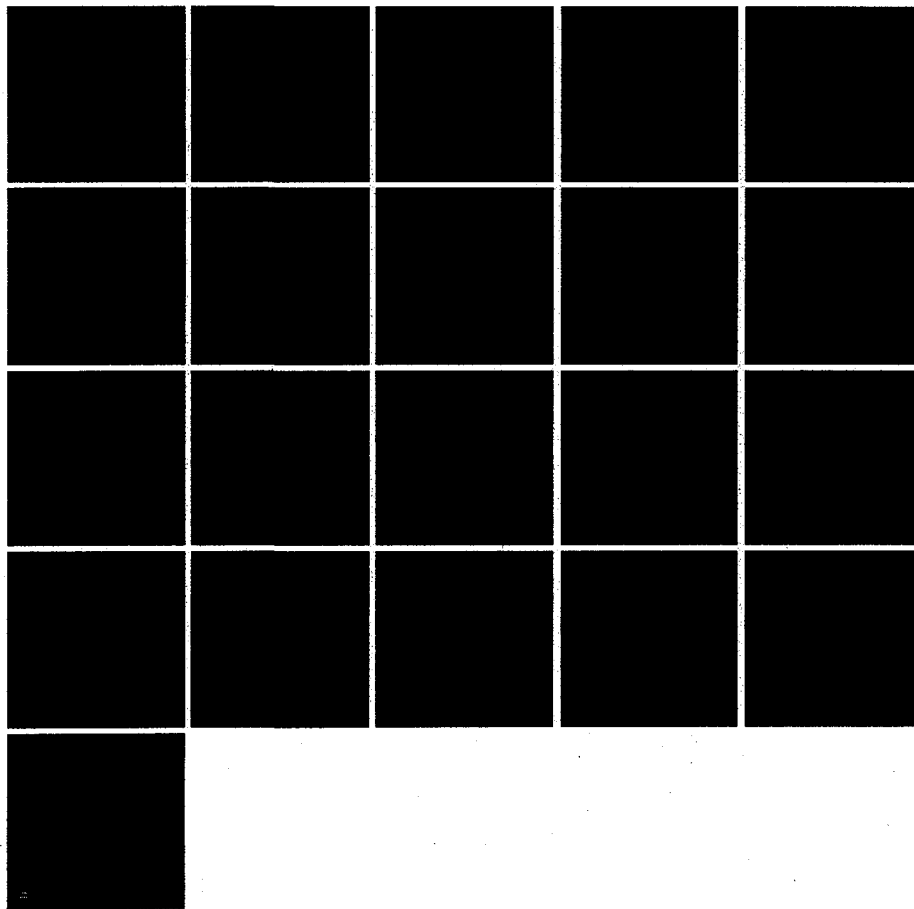


Figure 32 : Mex07 se localise de façon diffuse en immunofluorescence avec la microscopie confocale. La fluorescence verte indique la détection des anticorps IgG anti-Mex07 liés à Mex07 par les anticorps secondaires anti-IgG. Les différentes images représentent des tranches de 0,1 μm . Barre, 1 μm .

2.2.3 Localisation des protéines DgcK, DgcL et Mex07 par fractionnement cellulaire

Le fractionnement cellulaire a été employé pour déterminer dans quelle partie de la cellule se localisent ces protéines. Une souche de *V. cholerae* N16961 a été utilisée comme contrôle négatif. Cette même souche surexprimant DgcK, DgcL ou Mex07 (Tableau 2) ont été utilisées pour les différentes localisations. Deux méthodes de fractionnement cellulaire ont été employées. Elles sont nommées BR pour Brissette et Russel (1990) et RK pour Russel et Kazmierczak (1993), les équipes qui les ont publiées. Les protéines du périplasme, cytoplasme et des membranaires ont été récupérées par la méthode BR et les protéines du périplasme/cytoplasme, de la membrane interne et de la membrane externe, par la méthode RK. Ces deux méthodes ont été effectuées en parallèle pour valider les résultats obtenus entre elles.

La figure 33A représente le contrôle négatif *V. cholerae* N16961 pour DgcK. Certaines protéines cytoplasmiques et membranaires sont détectées dans les fractions recueillies du contrôle sans lysozyme ainsi que dans celles avec lysozyme mais aucune ne correspond à la taille de DgcK qui est de 47 kD. Les mêmes bandes, dont une supplémentaire dans la fraction périplasmique, apparaissent à la figure 33B où les fractions ont été obtenues avec *V. cholerae* N16961 dans laquelle DgcK est surexprimée. De plus, on note la détection de protéines cytoplasmiques et membranaires dans les fractions contrôles sans lysozyme et dans celles avec lysozyme où DgcK est présente, très faiblement, et dont la taille correspond à environ 47 kD. La méthode de fractionnement cellulaire RK ne confirme pas la détection de DgcK dans le cytoplasme ou associée à la membrane. Il n'est pas possible de détecter la présence de protéines sur le gel SDS-PAGE pour cette méthode. Par ailleurs, la sensibilité de la coloration au bleu de Coomassie étant faible, on ne peut écarter la possibilité que les protéines ne soient pas transférées sur la membrane lors de l'immunobuvardage de type Western.

La figure 34A représente le contrôle négatif *V. cholerae* N16961 pour DgcL. Aucune protéine n'est détectée dans les différentes fractions de ce contrôle. La figure 34B représente les fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcL.

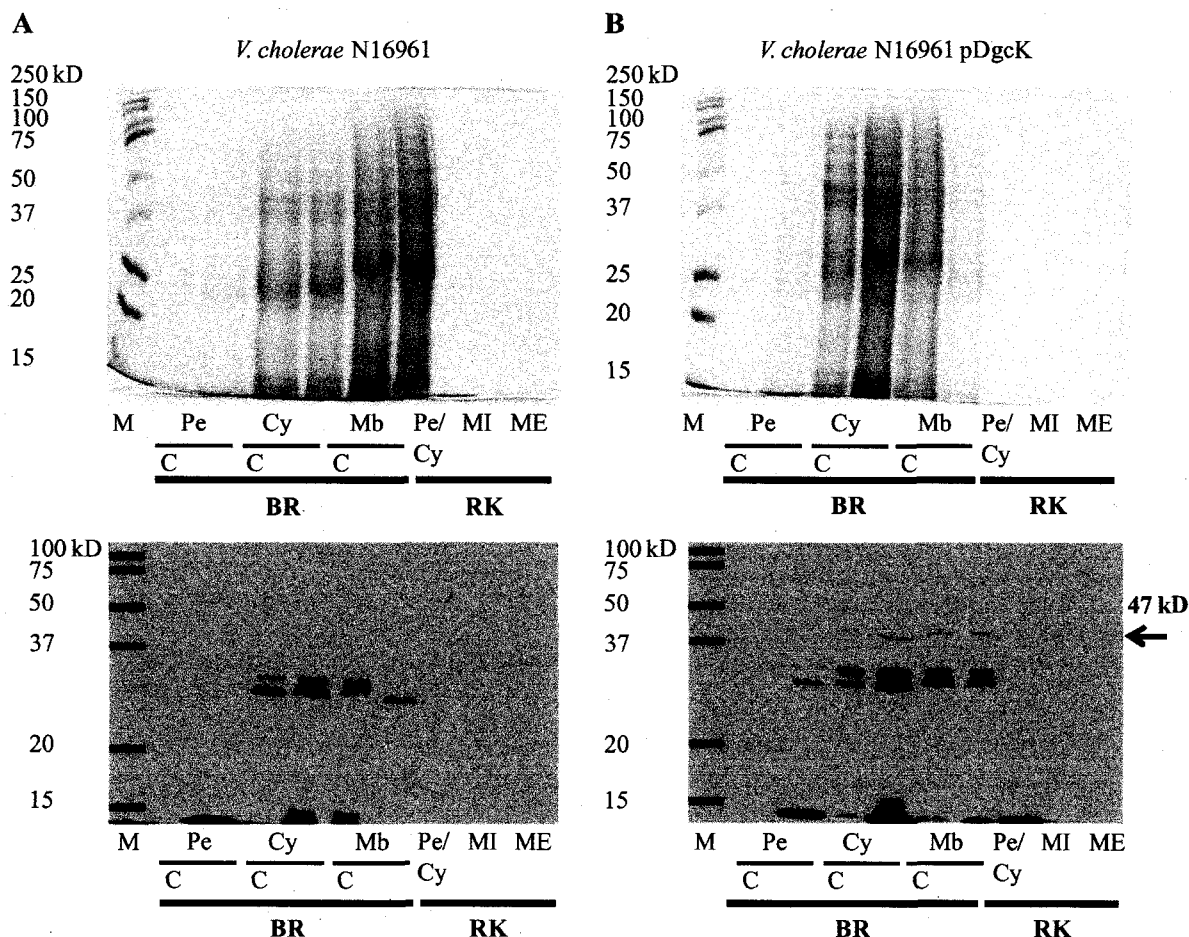


Figure 33 : Localisation de DgcK par fractionnement cellulaire.

Le gel SDS-PAGE représente la migration des différentes fractions et sa coloration au bleu de Coomassie. Le film représente la détection de la membrane incubée avec le sérum recueilli du sang prélevé après la deuxième vaccination qui contient les anticorps anti-DgcK. A. Contrôle négatif représentant les différentes fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961. B. Localisation de DgcK dans différentes fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcK. BR et RK sont les deux méthodes de fractionnement cellulaire utilisées. C : contrôle sans lysozyme, Pe : périplasme, Cy : cytoplasme, Mb : membrane, Pe/Cy : périplasme et cytoplasme, MI : membrane interne, ME : membrane externe. La dilution du sérum est de 1/16 000. Le temps d'exposition pour la détection sur le film est de 2 min.

La dilution d'anticorps utilisée était deux fois plus élevée que celle utilisée pour déterminer la spécificité des anticorps (Figure 23C et D) donc une plus faible concentration d'anticorps était disponible, ce qui a conféré une plus grande spécificité. La détection d'une seule bande d'environ 34 kD est observée à la figure 34B dans les fractions périplasmiques,

cytoplasmiques et membranaires des contrôles sans lysozyme ainsi que dans celles avec lysozyme pour la méthode BR.

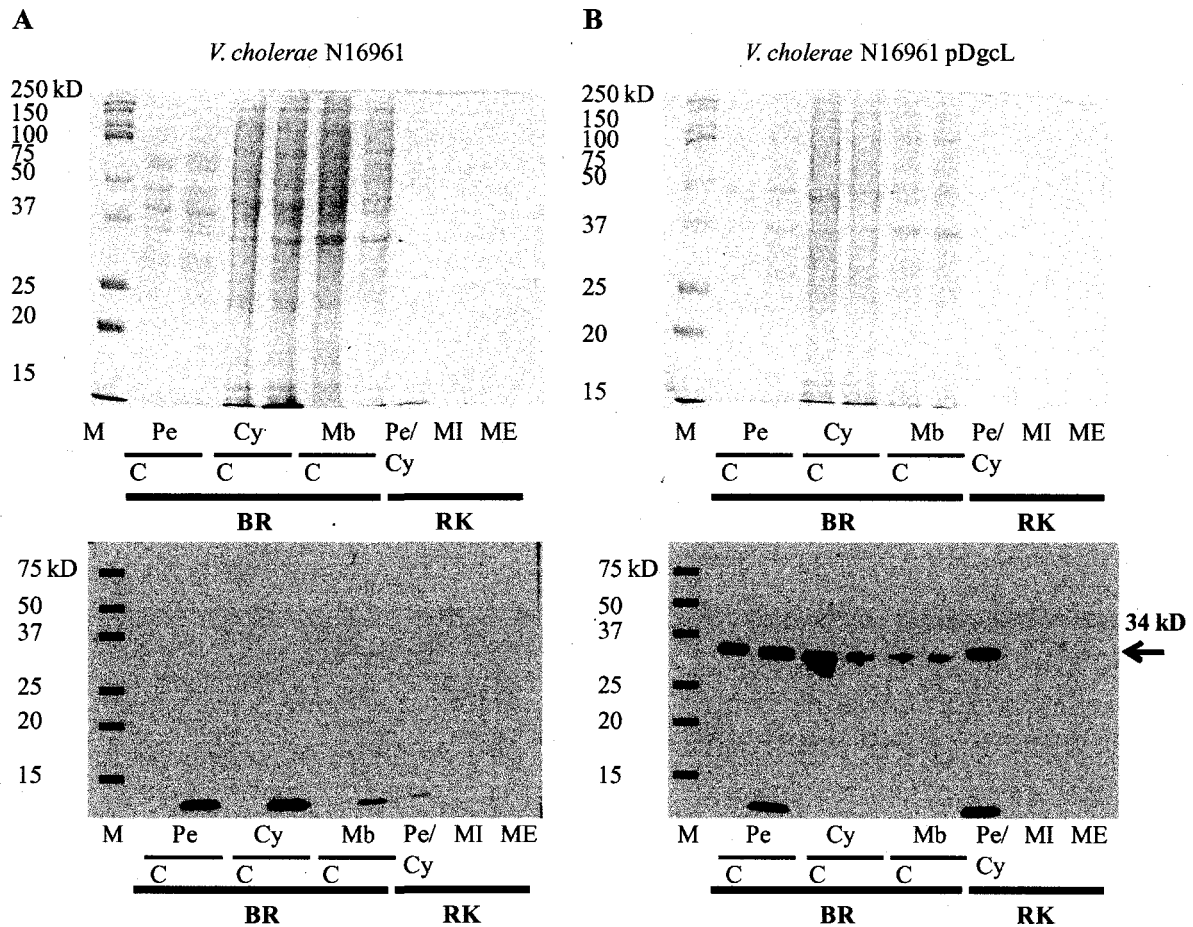


Figure 34 : Localisation de DgcL par fractionnement cellulaire.

Le gel SDS-PAGE représente la migration des différentes fractions et sa coloration au bleu de Coomassie. Le film représente la détection de la membrane incubée avec les anticorps extraits du jaune d'un œuf après la troisième vaccination qui contient les anticorps anti-DgcL. A. Contrôle négatif représentant les différentes fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961. B. Localisation de DgcL dans différentes fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961 surexprimant DgcL. BR et RK sont les deux méthodes de fractionnement cellulaire utilisées. C : contrôle sans lysozyme, Pe : périplasme, Cy : cytoplasme, Mb : membrane, Pe/Cy : périplasme et cytoplasme, MI : membrane interne, ME : membrane externe. La dilution des anticorps est de 1/64 000. Le temps d'exposition pour la détection sur le film est de 30 secondes.

L'intensité des bandes est toutefois plus élevée dans les fractions périplasmiques et dans le contrôle de la fraction cytoplasmique. Pourtant, plus de protéines sont révélées dans les fractions cytoplasmiques par la coloration du gel au bleu de Coomassie. Il est possible d'envisager que les protéines aient mal transférées sur la membrane. On note également l'apparition d'une bande nette de même taille dans la fraction périplasme/cytoplasme obtenue à l'aide de la méthode RK. Cette dernière associe donc la présence de DgcL dans le périplasme ou dans le cytoplasme de la cellule. Une contamination des différentes fractions cellulaires de la première méthode de fractionnement rend impossible de valider exactement où se trouve DgcL puisqu'on la retrouve également associée à la membrane. Les méthodes BR et RK de fractionnement cellulaire confirme la localisation de DgcL dans le cytoplasme.

La figure 35A représente le contrôle négatif *V. cholerae* N16961 pour Mex07. Aucune protéine n'est détectée dans les différentes fractions de ce contrôle négatif. La figure 35B représente les fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961 surexprimant Mex07. Plusieurs bandes sont observées dans les fractions périplasmiques, cytoplasmiques et membranaires des contrôles sans lysozyme ainsi que dans celles avec lysozyme. La bande de plus grande taille fait environ 141 kD. Elle correspond à la protéine Mex07. L'intensité des bandes dans les fractions cytoplasmiques et membranaires est plus forte. Les bandes de plus faibles tailles sont probablement des produits résultants du clivage de Mex07 ou des produits de dégradation puisque qu'aucune bande n'est observée dans le contrôle négatif en absence de Mex07. Une contamination des différentes fractions cellulaires de la méthode de fractionnement BR rend impossible de valider exactement où se trouve Mex07 puisqu'on la retrouve également dans le périplasme et le cytoplasme. Cependant, il est possible d'envisager que Mex07 soit associée à la membrane interne puisqu'on note l'apparition d'une nette bande d'une taille de 141 kD dans la fraction de la membrane interne obtenue à l'aide de la méthode de fractionnement RK.

Les expériences de fractionnement cellulaire doivent être répétées et un soin particulier doit être effectué pour éviter toute contamination entre surnageant et culot des différentes fractions.

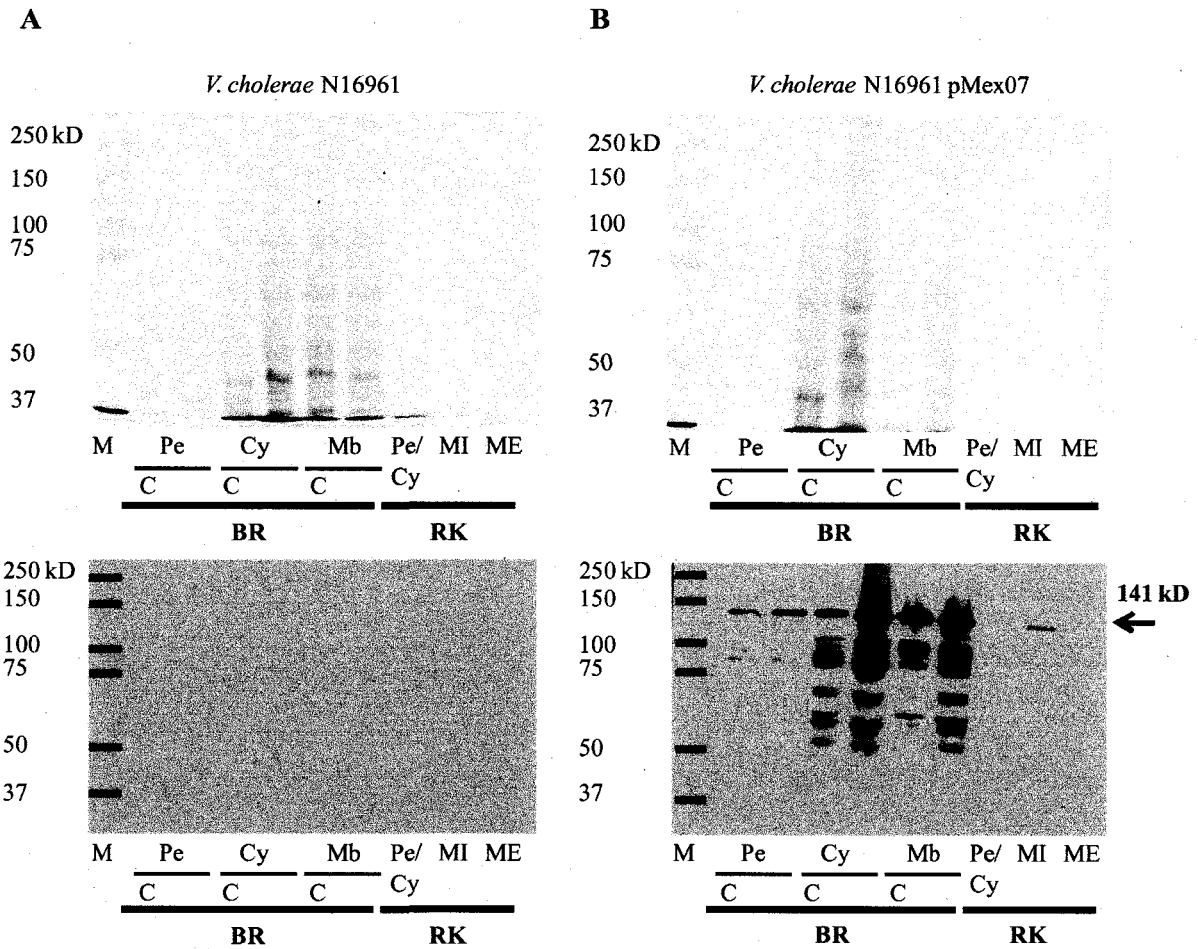


Figure 35 : Localisation de Mex07 par fractionnement cellulaire.

Le gel SDS-PAGE représente la migration des différentes fractions et sa coloration au bleu de Coomassie. Le film représente la détection de la membrane incubée avec le sérum recueilli du sang prélevé après la deuxième vaccination qui contient les anticorps anti-Mex07. A. Contrôle négatif représentant les différentes fractions obtenues avec la souche *V. cholerae* N16961. B. Localisation de Mex07 dans différentes fractions obtenues avec *V. cholerae* N16961 surexprimant Mex07. BR et RK sont les deux méthodes de fractionnement cellulaire utilisées. C : contrôle sans lysozyme, Pe : périplasme, Cy : cytoplasme, Mb : membrane, Pe/Cy : périplasme et cytoplasme, MI : membrane interne, ME : membrane externe. La dilution du sérum est de 1/50 000. Le temps d'exposition pour la détection sur le film est de 30 secondes.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Tout d'abord, les objectifs de cette étude étaient de déterminer les conditions de régulation de l'expression des promoteurs *PdgcK* et *PdgcL* et de déterminer la localisation intracellulaire des protéines DgcK, DgcL et Mex07.

3.1 Conditions de régulation de l'expression du promoteur *PdgcK*

Les prochains résultats discutés présentent les conditions optimales permettant l'expression du promoteur *PdgcK*. Il a été démontré qu'une température de 37 °C est considérée comme favorable à l'activation de l'expression du promoteur *PdgcK* qui est en effet plus élevée qu'à 30 °C (Figure 13). L'expression la plus élevée a également été observée en phase stationnaire. Une analyse bioinformatique de la séquence intergénique entre les gènes *mex04* et *dgcK* d'*ICEVchMex1* a été réalisée à l'aide du logiciel de prédiction de promoteurs *BPRM* de *Softberry* (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>). Elle a permis de localiser un site de liaison RpoS (σ^S) (Figure 36). L'activation de la liaison du facteur sigma RpoS est modulée par plusieurs signaux de stress dont l'atteinte de la phase stationnaire durant laquelle la concentration en nutriments est plus faible (Gruber and Gross, 2003; Silva and Benitez, 2004).

La population bactérienne est également plus nombreuse à 37 qu'à 30 et 42 °C. Ce résultat suggère que 37 °C est la température la plus favorable pour la croissance bactérienne et l'activation de l'expression du promoteur *PdgcK*. Une température de 30 °C a été choisie pour représenter une condition environnementale. Une plus faible expression du promoteur ainsi qu'une légère hausse d'activité, également en phase stationnaire, ont été observées.

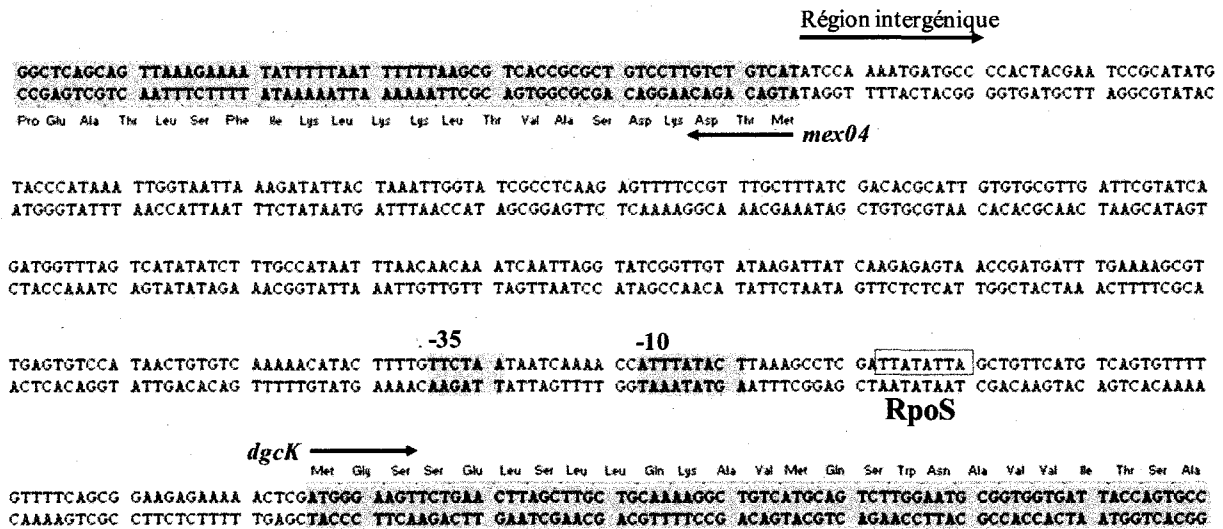
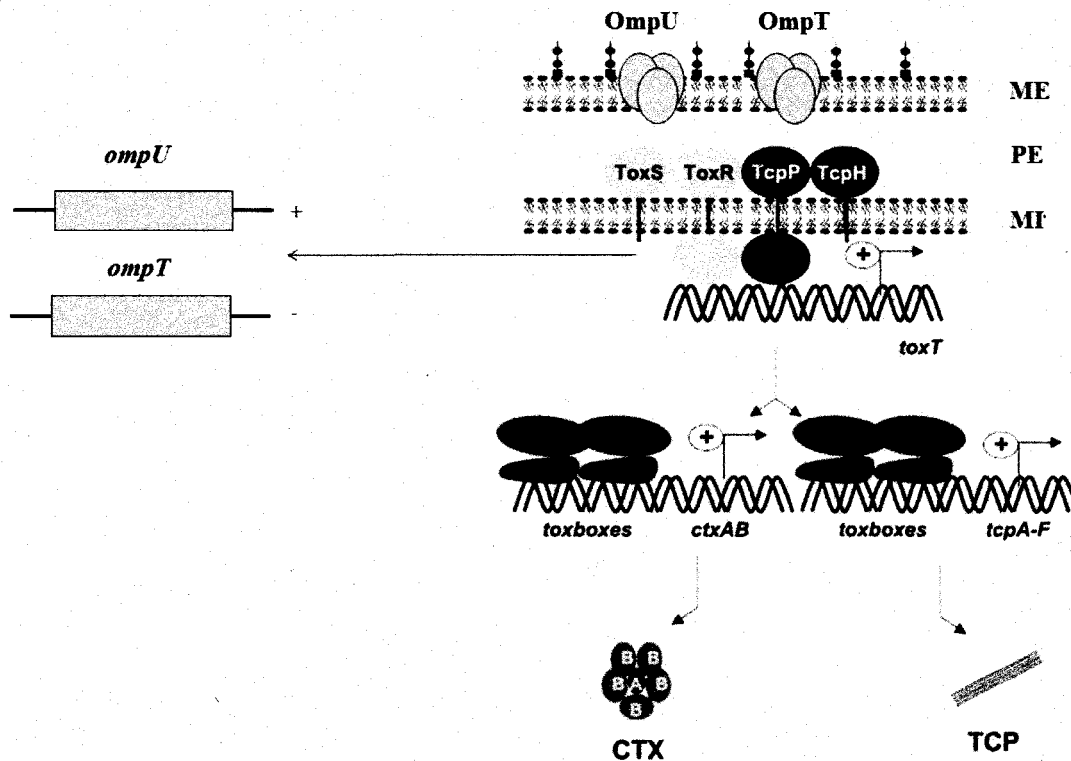


Figure 36 : Localisation putative du site de liaison du facteur sigma de phase stationnaire RpoS (σ^S). Région intergénique entre les gènes *mex04* et *dgkK* d'*ICEVchMex1* où est situé le site de liaison du RpoS. -35, -10 et RpoS ont été prédits par *Softberry*.

Une température de 42 °C a été choisie pour représenter une condition défavorable de croissance pour les bactéries, soit un choc thermique qui a été démontré. Cependant, il n'est pas possible de conclure que cette température ait eu un effet sur l'expression du promoteur *PdgkK* car les décomptes de survie étaient nuls après 8 h de croissance. Ce choix de température a peut-être été trop drastique pour *V. cholerae* qui peut se retrouver dans des eaux d'une température pouvant aller jusqu'à 4 °C dans l'environnement et 37 °C dans le tube digestif. Les décomptes bactériens nuls peuvent s'expliquer par la mort des cellules ou par l'entrée des cellules dans un état de dormance. Les cellules en dormance sont viables mais non cultivables sur les milieux normalement utilisés en conditions expérimentales (*VBNC*). Les *VBNC* ont la capacité de réenclencher leurs activités métaboliques ainsi que leur pathogénicité (Asakura *et al.*, 2007). Cette température a donc pu causer l'entrée en dormance de *V. cholerae*.

La présence de sels biliaires dans le milieu de culture a également été étudiée. Elle mime une condition physiologique que les bactéries ingérées par l'humain vont rencontrer lors de leur passage dans le tractus gastro-intestinal. En effet, la bile sécrétée dans le duodénum proximal a

un effet toxique qui agit à la membrane bactérienne (Hung *et al.*, 2006). Plusieurs études ont démontré les effets des acides biliaires chez *V. cholerae*. Ils agissent sur la répression du régulon ToxR (Figure 37).



Adaptée de Reidl and Klose (2002) et Matson *et al.* (2007).

Figure 37 : Cascade de régulation impliquée dans le contrôle des gènes de virulence chez *V. cholerae*.

ToxR est une protéine régulatrice qui possède un domaine périplasmique. Elle se lie avec une autre protéine membranaire, ToxS. ToxR régule l'expression des gènes codant pour les porines OmpU et OmpT. ToxR et TcpP permettent l'activation de *toxT*. Cependant, ToxT répond également à des signaux environnementaux comme la température et la présence de bile (Matson *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2006). Il est impliqué dans l'expression de gènes de virulence dont celui de la toxine cholérique (TC) et de TCP (DiRita *et al.*, 2000). L'implication de ToxR est tout de même suggérée. Indirectement, les sels biliaires peuvent agir sur la modulation de l'expression de la toxine cholérique et de gènes de mobilité (Gupta

and Chowdhury, 1997; Hung and Mekalanos, 2005), sur l'augmentation de la formation de biofilms (Hung *et al.*, 2006) et sur la modulation de l'expression des gènes codant pour les porines OmpU et OmpT qui confèrent une résistance aux acides biliaires (Provenzano and Klose, 2000).

Puisque DgcK possède une activité DGC ayant un effet sur la formation de biofilms ainsi que sur la mobilité, investiguer l'effet des sels biliaires s'est avéré approprié. La concentration de 0,4 % a été prise dans l'étude réalisée par Hung et Mekalanos (2005). Cet ajout de sels biliaires dans le milieu de culture n'a pas permis l'activation de l'expression du promoteur *PdgcK* bien qu'ils affectent la croissance bactérienne (Figure 14). Ainsi, une température de 37 °C représente une condition pouvant être associée à un contexte physiologique d'infection. Ceci suggère donc que lors du passage dans le tractus gastro-intestinal d'une bactérie possédant ICE*VchMex1* dans son génome, le gène *dgkK* sera exprimé par la température, entraînant vraisemblablement une hausse de la concentration de c-di-GMP intracellulaire. La virulence chez *V. cholerae* est associée à une forte mobilité de la bactérie et la persistance en milieu environnemental, à la formation de biofilms (Schild *et al.*, 2008). L'expression d'une DGC permet la synthèse de c-di-GMP associé à l'augmentation de formation de biofilms et à la diminution de la mobilité et de l'expression des gènes de virulence (Jenal and Malone, 2006). Dans le stage avancé de l'infection, l'expression de gènes, notamment ceux codant pour les DGC, est induite afin d'augmenter la concentration en c-di-GMP en vue de l'expulsion de *V. cholerae* dans son environnement aquatique (Schild *et al.*, 2008). Donc, il est possible de suggérer que la condition permettant la plus forte activité du promoteur *PdgcK* représente un stade avancé d'infection. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un modèle d'infection murin avec *V. cholerae* ICE*VchMex1* de type sauvage versus *V. cholerae* ICE*VchMex1* Δ *dgkK*.

Le Triton X-100 a été choisi comme second composé à ajouter dans le milieu de croissance dans le but d'observer son effet de détergent à la membrane et sur l'activation de l'expression du promoteur *PdgcK* puisqu'il a des propriétés de détergent non ionique (Provenzano *et al.*,

2000). Le Triton X-100 à une concentration de 0,1 % a déjà été utilisé dans l'étude réalisée par Hung et Mekalanos (2005). Tout comme l'effet observé en présence de sels biliaries, le Triton X-100 ne permet pas l'expression du promoteur *PdgcK*. L'activité observée est due à la phase de croissance et non à la présence de Triton X-100 dans le milieu (Figure 14).

3.2 Localisation polaire de DgcK

Il a été démontré que DgcK se localise à un pôle cellulaire (Figure 18 et 19). Cependant, à la figure 19, la majorité des cellules n'exprime pas la protéine recombinante DgcK::GFPmut3. L'absence d'expression peut s'expliquer par l'utilisation du vecteur inductible commercial pBADTOPO dont l'expression est soit induite ou non. La localisation de DgcK en immunofluorescence (Figures 24 à 26) a permis de confirmer sa localisation à un pôle. L'emploi de la microscopie confocale (Figure 26) a permis d'obtenir des images de plus fort grossissement. La localisation polaire de DgcK dans des conditions de surexpression ne fait aucun doute. Des expériences préliminaires ont également été menées avec des temps de surexpression de 2, 3 et 4 h (résultats non montrés). La localisation polaire de DgcK a aussi été observée.

Cette étude a permis d'obtenir les constructions *dgkK::GFPmut3* intégrées dans le génome bactérien de *V. cholerae* N16961. Des expériences préliminaires ont été réalisées avec la fusion chromosomique *dgkK::gfpmut3* (résultats non montrés). Les cellules ont été observées après 24 et 30 h de croissance à 37 °C où une augmentation de l'expression du promoteur *PdgcK* a été observée lors des essais de régulation de l'expression (Figure 13). La morphologie des cellules n'a pas permis de conclure à la localisation des protéines. Les cellules de *V. cholerae* avaient effectivement perdu leur forme de bâtonnet incurvé pour une forme sphérique. En effet, la cellule en manque de nutriments prend une forme sphérique qui rend impossible de localiser la protéine à un pôle. Une étude réalisée par Lam et ses collègues (2009) a permis d'établir la présence d'acides aminés d'énantiomère D sécrétés dans le milieu et qui agissent au niveau du peptidoglycane. Les cellules prennent alors une forme arrondie. Il serait donc intéressant de tester ces constructions, ainsi que la protéine sauvage, à des temps

de croissance plus courts et dans différentes conditions expérimentales, comme par exemple en présence de sels biliaires. L'utilisation de la microscopie électronique permettrait aussi de confirmer la localisation polaire. Les images obtenues seraient plus précises que celles obtenues en fluorescence où il n'est pas possible d'observer les différentes parties de la bactérie.

La localisation dans le temps de la protéine serait également à étudier. Les expériences de cette étude, ayant été réalisées après 1 h d'expression, il serait intéressant d'investiguer le mouvement intracellulaire de la protéine pendant cette heure. En effet, des structures en spirales ont été observées pour DgcK même si elles semblent moins spécifiques que la localisation polaire. Elles suggèrent un mouvement intracellulaire de la protéine (Figures 24 à 26). Bien que ces structures puissent être le résultat d'artéfacts dus à une répartition non uniforme des anticorps dans la cellule, elles ont déjà été observées précédemment. En effet, lors d'essais de mise au point en microscopie à épifluorescence, un mouvement en forme de spirale a été observé chez la souche *E. coli* CAG18439 qui contenait le plasmide *pdgcK::gfpmut3* surexprimé (résultats non montrés). Ce mouvement est similaire à celui produit par les protéines *actin-like* de la famille MreB chez *V. cholerae*. Ces protéines forment des structures spiralées dans le cytoplasme, jouent un rôle dans la régulation de la forme cellulaire et sont impliquées dans la polarité cellulaire et la ségrégation chromosomique (Thanbichler and Shapiro, 2008). Bien qu'aucune évidence n'attribue de lien entre les DGC et les protéines de la famille MreB, on peut tout de même émettre l'hypothèse que DgcK pourrait s'associer à ces protéines de structure *actin-like* pour se localiser au pôle. Il serait intéressant de colocaliser MreB et DgcK. D'autres études ont démontrées la présence de DGC se localisant à un pôle cellulaire. Notamment, Shapiro et ses collègues (2009) ont démontré que la DGC PleD, retrouvée chez *C. crescentus* se localise au pôle mais contrairement à DgcK, ne forme pas de spirale.

De plus, nous n'avons pas été en mesure d'identifier à quel pôle DgcK se localise. L'emploi d'anticorps anti-flagelline révélerait si DgcK se retrouve au pôle du flagelle ou bien à son opposé. Le c-di-GMP agit sur la mobilité de *V. cholerae*. La présence de DgcK au pôle du

flagelle pourrait suggérer la possibilité d'un rôle joué par le c-di-GMP en contrôlant l'expression des gènes de mobilité au niveau du flagelle. Il peut, par conséquent, avoir une influence au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel, au niveau de la fonction ou bien encore de l'éjection du flagelle (Wolfe and Visick, 2008). Boehm et ses collègues (2010) ont également démontré qu'un manque de nutriments et un ralentissement de la vitesse d'*E. coli* permet l'activation d'un réseau de protéines ajustant la concentration cellulaire en c-di-GMP et suggère cette réaction comme étant une adaptation à ce manque.

Les expériences de fractionnement cellulaire localisent DgcK dans le cytoplasme ainsi qu'à la membrane. Ce résultat coïncide avec les prédictions informatiques qui suggèrent que DgcK est une protéine cytoplasmique avec une région transmembranaire. Les méthodes de fractionnement (Figure 33) employées devront cependant être répétées pour mieux définir les résultats. Des contrôles devront également être utilisés. Par exemple, l'utilisation de OmpU ou OmpA, des porines de la membrane externe de *V. cholerae* pourrait être envisagée (Freudl *et al.*, 1985; Provenzano and Klose, 2000), ainsi que FrdD et SetR des protéines de la membrane interne et du cytoplasme, respectivement (Beaber and Waldor, 2004; Westenberg *et al.*, 1993). De plus, une méthode de centrifugation différentielle serait intéressante à mettre au point pour confirmer les résultats obtenus.

Il est possible d'observer la présence de bandes dans le contrôle négatif (Figure 33A). Comme mentionné dans la section concernant la production de la protéine DgcK, la souche *V. cholerae* N19691 a été utilisée pour contrer des problèmes de production de protéines normalement réalisée avec la souche *E. coli* BL21. Les concentrations de protéines étaient très faibles et ces dernières étaient faiblement visibles sur gel SDS-PAGE. Lors d'une production de protéines, celles-ci sont évidemment dans des conditions de surexpression. DgcK, étant une DGC, sa surexpression permet la synthèse d'une grande quantité de c-di-GMP dans la cellule. Une étude réalisée par Ryjenkov et son équipe (2005) nous a mis sur la piste que peut-être le problème dépendait de la souche utilisée pour la production. En effet, ils ont démontré la toxicité du c-di-GMP pour la souche *E. coli* BL21 lors de la production d'enzymes DGC (Ryjenkov *et al.*, 2005). Nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation d'une souche de *V.*

cholerae ayant la capacité de supporter des concentrations élevées en c-di-GMP. Les anticorps dirigés contre DgcK obtenus lors de l'immunisation animale chez le lapin se sont donc révélés spécifiques à cette même protéine. Certaines protéines ont donc été détectées dans le contrôle négatif. Ceci suggère qu'une proportion des anticorps produits est dirigée contre des protéines de *V. cholerae* qui ont dues se retrouver dans le vaccin. Ces anticorps ne sont cependant pas présents en majorité. L'augmentation de la dilution d'anticorps utilisée permet également de réduire leur liaison aux protéines de *V. cholerae* car leur spécificité vis-à-vis DgcK est augmentée. Il est possible de confirmer ce dire car la dilution d'anticorps employée pour le test de spécificité était de 1/32 000 (Figure 23B) tandis que celle employée pour le fractionnement cellulaire était de 1/16 000. Une dilution de 1/32 000 pour le fractionnement ne permettait pas de détecter DgcK (résultats non montrés). Cette méthode nécessite encore de l'optimisation.

3.3 Conditions de régulation de l'expression du promoteur *PdgcL*

Les prochains résultats discutés présentent les conditions optimales permettant l'expression du promoteur *PdgcL*. La température n'a pas démontré d'effet particulier sur l'expression du promoteur *PdgcL* bien qu'il soit possible d'observer une hausse de l'activité en phase stationnaire à 30 et 37 °C (Figure 15). La présence d'un site de liaison pour un facteur sigma de phase stationnaire RpoS en amont de *dgcL* n'a pas été démontrée ici, contrairement à *dgcK* (Figure 36). L'ajout de 0,4 % de sels biliaires dans le milieu de culture ainsi que celui de 0,1 % de Triton X-100 ont été réalisés pour les mêmes raisons que celles citées précédemment pour *dgcK*. La présence de sels biliaires a permis une nette augmentation de l'expression du promoteur *PdgcL* bien qu'ils affectent la croissance cellulaire et ce, bien davantage et de façon plus précoce que ce qui a été observé avec *PdgcK* (Figure 16). L'ajout de 0,1 % de Triton X-100 dans le milieu de culture n'a pas permis d'observer une augmentation de l'expression du promoteur *PdgcL*.

Si DgcL et Mex07 forment bien un système de transduction de signal à deux composantes, il est possible que nous soyons passés à côté d'une condition d'expression optimale puisque la

protéine DgcL est absente. L'étude des conditions d'expression avec des fusions où le gène *dgcL* est complet serait très intéressante. Il est également impossible de déterminer l'implication du domaine REC et la phosphorylation de DgcL dans ce contexte. La modulation de l'activité de DgcL due à certaines modifications post-transcriptionnelles et post-translationnelles est absente.

3.4 Localisation de DgcL et Mex07

Dans le but de localiser DgcL, la protéine fluorescente GFPmut3 a également été utilisée pour les mêmes raisons que celles citées précédemment dans la section portant sur DgcK. DgcL ne se localise pas au même endroit chez les différentes cellules (Figures 20 et 21). Des expériences préliminaires ont également été menées avec des temps de surexpression de 2, 3 et 4 heures de la protéine recombinante DgcL::GFPmut3 (résultats non montrés). La localisation restait la même pour DgcL. La localisation de DgcL en immunofluorescence (Figures 27 et 28) a permis d'observer une fluorescence plutôt diffuse dans la cellule et quelquefois plus marquée aux pôles. L'emploi de la microscopie confocale (Figure 29) a permis d'obtenir des images de plus fort grossissement et où la localisation de DgcL est diffuse dans la cellule.

Des expériences préliminaires ont été réalisées avec la fusion chromosomique *dgcL::gfpmut3* chez *V. cholerae* N16961 (résultats non montrés). Les cellules ont été observées après 24 et 30 h de croissance à 37 °C. Les résultats sont les mêmes que ceux obtenus pour DgcK dû aussi au changement morphologique des cellules.

Ces expériences de localisation ont été réalisées en absence de Mex07. Il serait pertinent d'investiguer le rôle que peut jouer Mex07 dans la localisation de DgcL. Il est possible d'envisager que DgcL se localise à un endroit précis dans la membrane et non pas à différentes localisations, polaires et subpolaires, seulement quand elle interagit avec Mex07.

La méthode de fractionnement cellulaire BR localise DgcL dans chaque partie de la cellule (Figure 34 B). Les différentes fractions ont dues être contaminées entre elles. La méthode de

fractionnement RK, quant à elle, localise DgcL dans le périplasme ou dans le cytoplasme. Ce résultat ne coïncide pas avec les prédictions informatiques qui suggèrent que DgcL est une protéine localisée à la membrane interne. Toutefois, l'absence de Mex07 dans ce contexte peut expliquer que DgcL soit dans le cytoplasme. En présence de Mex07, DgcL peut être amené à la membrane interne pour interagir avec cette dernière. Les méthodes de fractionnement devront être répétées pour mieux définir les résultats. Des contrôles devront également être utilisés. Les exemples sont cités plus haut dans la section portant sur DgcK.

La présence putative de DgcL à la membrane interne appuie l'hypothèse de sa participation à un système de transduction de signal à deux composantes. En effet, il est envisagé que DgcL et Mex07 interagissent physiquement dans la cellule et Mex07 est prédite comme étant une protéine de la membrane interne. Si on émet l'hypothèse que DgcL se localise effectivement à la membrane interne, le résultat obtenu par la méthode de fractionnement cellulaire « RK » peut être éclairci (Figure 34B). Il est logique de présumer que DgcL soit synthétisé dans le cytoplasme et c'est pourquoi les protéines y sont plus concentrées. L'absence de Mex07 dans ce contexte qui permettrait la « capture » de DgcL à la membrane interne pourrait expliquer l'absence de la protéine dans cette fraction. Il a été démontré chez *C. crescentus* que la protéine PleD, une DGC telle que DgcL, est séquestrée à un pôle seulement lorsque phosphorylée par une des histidines kinases polaires PleC ou DivJ. (Paul *et al.*, 2004). Ce phénomène pourrait être similaire à celui émis pour DgcL et Mex07.

La localisation de Mex07 en immunofluorescence a permis d'observer une fluorescence plutôt diffuse dans la cellule et quelquefois plus marquée aux pôles (Figures 30 et 31). L'emploi de la microscopie confocale a permis d'obtenir des images de plus fort grossissement (Figure 32). Le résultat observé est le même. Il serait intéressant de tester quelles conditions expérimentales permettent l'expression de la protéine sauvage. Il serait également intéressant d'utiliser la microscopie électronique pour confirmer sa localisation à la membrane interne comme les analyses bioinformatique le suggèrent.

La méthode de fractionnement cellulaire BR localise Mex07 dans chaque fraction cellulaire mais l'intensité des bandes est plus forte dans les fractions cytoplasmiques et membranaires (Figure 35B). On note également la présence d'autres bandes qui donnent sensiblement le même profil. Ces bandes peuvent être le résultat d'une dégradation de Mex07 ou bien de son clivage, car elles ne sont pas détectées dans le contrôle négatif (Figure 35A). Les différentes fractions ont également pûes être contaminées entre elles. La méthode de fractionnement RK, quant à elle, vient appuyer l'analyse informatique. Elle localise Mex07 à la membrane interne. La présence putative de Mex07 à la membrane interne est en accord avec l'hypothèse de sa participation dans un système de transduction de signal à deux composantes avec DgcL. Les méthodes de fractionnement devront être également affinées.

CONCLUSION

Les objectifs précédemment émis pour cette étude étaient : 1) Déterminer la régulation de l'expression des gènes *dgcK* et *dgcL* dans différentes conditions expérimentales à l'aide d'essais β -galactosidase et 2) Déterminer la localisation intracellulaire des protéines DgcK, DgcL et Mex07 par l'utilisation de la microscopie.

Les résultats obtenus suggèrent que l'activité du promoteur *PdgcK* est régulée en fonction d'une température de croissance de 37 °C. La protéine DgcK a été prédite comme étant une protéine cytoplasmique et se localise, en surexpression, à un pôle cellulaire chez *V. cholerae*. Sa localisation polaire est suggérée comme ayant un impact sur sa fonction principale DGC impliquée dans la synthèse du c-di-GMP. Les résultats d'expression pour *dgcL* suggèrent que l'activité de son promoteur est régulée par des conditions ayant un effet de stress membranaire soient la présence de sels biliaires. L'activité conjointe de *PdgcK* et *PdgcL* mime ainsi un contexte physiologique d'infection. Il est prédit que la protéine DgcL se localise à la membrane interne cellulaire chez *V. cholerae*. De plus, elle tiendrait le rôle d'une protéine effectrice dans un système de transduction de signal à deux composantes avec Mex07. L'observation de la variabilité de sa localisation en absence de sa protéine régulatrice Mex07 s'accorde avec l'hypothèse de cette interaction. Les prédictions suggèrent que la protéine Mex07 se localise également à la membrane interne et possède la capacité de détecter différents signaux de stress membranaire via son domaine CHASE. Les résultats obtenus au cours de ce projet confirment l'atteinte des deux premiers objectifs. Pour ce qui est du troisième, les résultats de localisation et la présence de différents domaines suggèrent seulement qu'il pourrait y avoir une interaction. Les outils moléculaires développés pendant ce projet permettront de confirmer ultérieurement ce que ces résultats obtenus suggèrent. Bien entendu, nous sommes encore très loin d'avoir réussi à élucider toutes les conditions possibles permettant la régulation de l'expression de ces gènes.

Plusieurs microorganismes possèdent des DGC endogènes. La présence inhabituelle de gènes codant des DGC fonctionnelles sur des éléments génétiques mobiles a son importance. Il a été démontré que différentes souches de *V. cholerae* possèdent les gènes codant pour les protéines DgcK, DgcL ou Mex07 sur plusieurs ICE distincts de la famille SXT/R391 (Figure 7). La dissémination de ces ICE pourrait contribuer à l'adaptation et à la survie de microorganismes dans des conditions environnementales. Notamment, la persistance en milieu environnemental de souches pathogènes pourra contribuer à l'augmentation de l'incidence des maladies infectieuses. Les mécanismes par lesquels agit le c-di-GMP ne sont pas encore tous élucidés et il reste encore beaucoup de travail à investir.

BIBLIOGRAPHIE

Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* 22, 3-6.

Amikam, D., Steinberger, O., Shkolnik, T., and Ben-Ishai, Z. (1995). The novel cyclic dinucleotide 3'-5' cyclic diguanylic acid binds to p21^{ras} and enhances DNA synthesis but not cell replication in the Molt 4 cell line. *Biochem. J.* 311 (Pt 3), 921-927.

Anantharaman, V., and Aravind, L. (2001). The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends Biochem. Sci.* 26, 579-582.

Aravind, L., and Koonin, E.V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 469-472.

Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S., and Igimi, S. (2007). Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state. *Environ. Microbiol.* 9, 869-879.

Beaber, J.W., Burrus, V., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002). Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 2065-2070.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72-74.

Beaber, J.W., and Waldor, M.K. (2004). Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J. Bacteriol.* 186, 5945-5949.

Begum, K., Ahsan, C.R., Ansaruzzaman, M., Dutta, D.K., Ahmad, Q.S., and Talukder, K.A. (2006). Toxin(s), other than cholera toxin, produced by environmental non O1 non O139 *Vibrio cholerae*. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 115-121.

Beyhan, S., Bilecen, K., Salama, S.R., Casper-Lindley, C., and Yildiz, F.H. (2007). Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of VpsT and VpsR regulons and epistasis analysis of *vpsT*, *vpsR*, and *hapR*. J. Bacteriol. 189, 388-402.

Beyhan, S., Odell, L.S., and Yildiz, F.H. (2008). Identification and characterization of cyclic diguanylate signaling systems controlling rugosity in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 190, 7392-7405.

Beyhan, S., Tischler, A.D., Camilli, A., and Yildiz, F.H. (2006). Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. J. Bacteriol. 188, 3600-3613.

Bilwes, A.M., Alex, L.A., Crane, B.R., and Simon, M.I. (1999). Structure of CheA, a signal-transducing histidine kinase. Cell 96, 131-141.

Blokesch, M., and Schoolnik, G.K. (2007). Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. PLoS Pathog. 3, e81.

Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M., Kaever, V., Sourjik, V., Roth, V., and Jenal, U. (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. Cell 141, 107-116.

Bomchil, N., Watnick, P., and Kolter, R. (2003). Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. J. Bacteriol. 185, 1384-1390.

Bordeleau, E., Brouillette, E., Robichaud, N., and Burrus, V. (2010). Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. Environ. Microbiol. 12, 510-523.

Boyd, E.F. (2010). Efficiency and specificity of CTX ϕ chromosomal integration: *dif* makes all the difference. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 3951-3952.

Breaker, R.R. (2008). Complex riboswitches. Science 319, 1795-1797.

Brissette, J.L., and Russel, M. (1990). Secretion and membrane integration of a filamentous phage-encoded morphogenetic protein. *J. Mol. Biol.* 211, 565-580.

Brown, N.L., Misra, T.K., Winnie, J.N., Schmidt, A., Seiff, M., and Silver, S. (1986). The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for mer genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol. Gen. Genet.* 202, 143-151.

Burrus, V., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006a). The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* 55, 173-183.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guedon, G. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46, 601-610.

Burrus, V., Quezada-Calvillo, R., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006b). SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3054-3057.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2003). Control of SXT integration and excision. *J. Bacteriol.* 185, 5045-5054.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004a). Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J. Bacteriol.* 186, 2636-2645.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004b). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155, 376-386.

Chatterjee, S., Ghosh, K., Raychoudhuri, A., Pan, A., Bhattacharya, M.K., Mukhopadhyay, A.K., Ramamurthy, T., Bhattacharya, S.K., and Nandy, R.K. (2007). Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during 2003. *J. Med. Microbiol.* 56, 824-832.

Chatterjee, S.N., and Chaudhuri, K. (2003). Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 1639, 65-79.

Cheng, Z., Kumagai, Y., Lin, M., Zhang, C., and Rikihisa, Y. (2006). Intra-leukocyte expression of two-component systems in *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma*

phagocytophilum and effects of the histidine kinase inhibitor closantel. *Cell. Microbiol.* 8, 1241-1252.

Cherepanov, P.P., and Wackernagel, W. (1995). Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9-14.

Chun, J., Grim, C.J., Hasan, N.A., Lee, J.H., Choi, S.Y., Haley, B.J., Taviani, E., Jeon, Y.S., Kim, D.W., Bretin, T.S., *et al.* (2009). Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 15442-15447.

Coetzee, J.N., Datta, N., and Hedges, R.W. (1972). R factors from *Proteus rettgeri*. *J. Gen. Microbiol.* 72, 543-552.

Cormack, B.P., Valdivia, R.H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38.

Cotter, P.A., and Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 17-23.

D'Argenio, D.A., Calfee, M.W., Rainey, P.B., and Pesci, E.C. (2002). Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *J. Bacteriol.* 184, 6481-6489.

D'Argenio, D.A., and Miller, S.I. (2004). Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology* 150, 2497-2502.

Dalsgaard, A., Serichantalergs, O., Forslund, A., Lin, W., Mekalanos, J., Mintz, E., Shimada, T., and Wells, J.G. (2001). Clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* serogroup O141 carry the CTX phage and the genes encoding the toxin-coregulated pili. *J. Clin. Microbiol.* 39, 4086-4092.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6640-6645.

Datta, S., Costantino, N., and Court, D.L. (2006). A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene* 379, 109-115.

Dean Goldring, J.P., and Coetzer, T.H.T. (2003). Isolation of chicken immunoglobulins (IgY) from egg yolk. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* 31, 185-187.

DiRita, V.J., Engleberg, N.C., Heath, A., Miller, A., Crawford, J.A., and Yu, R. (2000). Virulence gene regulation inside and outside. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 657-665.

Ellermeier, C.D., Janakiraman, A., and Slauch, J.M. (2002). Construction of targeted single copy *lac* fusions using λ Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* 290, 153-161.

Faruque, S.M., Albert, M.J., and Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1301-1314.

Freudl, R., Schwarz, H., Klose, M., Movva, N.R., and Henning, U. (1985). The nature of information, required for export and sorting, present within the outer membrane protein OmpA of *Escherichia coli* K-12. *EMBO J.* 4, 3593-3598.

Gerlach, R.G., Holzer, S.U., Jackel, D., and Hensel, M. (2007). Rapid engineering of bacterial reporter gene fusions by using Red recombination. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4234-4242.

Ghosh, R., Nair, G.B., Tang, L., Morris, J.G., Sharma, N.C., Ballal, M., Garg, P., Ramamurthy, T., and Stine, O.C. (2008). Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats. *FEMS Microbiol. Lett.* 288, 196-201.

Giddens, S.R., Jackson, R.W., Moon, C.D., Jacobs, M.A., Zhang, X.X., Gehrig, S.M., and Rainey, P.B. (2007). Mutational activation of niche-specific genes provides insight into regulatory networks and bacterial function in a complex environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 18247-18252.

Gruber, T.M., and Gross, C.A. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu. Rev. Microbiol.* 57, 441-466.

Gupta, S., and Chowdhury, R. (1997). Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 65, 1131-1134.

Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J., and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J. Bacteriol.* 177, 4121-4130.

Harlow, E., and Lane, D. (1989). *Antibodies: a laboratory manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory).

Harry, E.J., Pogliano, K., and Losick, R. (1995). Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 3386-3393.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., *et al.* (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477-483.

Hickman, J.W., and Harwood, C.S. (2008). Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol. Microbiol.* 69, 376-389.

Hung, D.T., and Mekalanos, J.J. (2005). Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 3028-3033.

Hung, D.T., Zhu, J., Sturtevant, D., and Mekalanos, J.J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 59, 193-201.

Ishihara, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., Kamegaya, T., Yamada, K., Okamoto, A., Hasegawa, T., and Ohta, M. (2009). Effect of cyclic bis(3'-5')diguanlylic acid and its analogs on bacterial biofilm formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 301, 193-200.

Janiak-Spens, F., Sparling, D.P., and West, A.H. (2000). Novel role for an HPt domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain. *J. Bacteriol.* 182, 6673-6678.

Jenal, U., and Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 40, 385-407.

Karaolis, D.K., Means, T.K., Yang, D., Takahashi, M., Yoshimura, T., Muraille, E., Philpott, D., Schroeder, J.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y., *et al.* (2007). Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule. *J. Immunol.* 178, 2171-2181.

Karaolis, D.K., Rashid, M.H., Chythanya, R., Luo, W., Hyodo, M., and Hayakawa, Y. (2005). c-di-GMP (3'-5'-cyclic diguanylic acid) inhibits *Staphylococcus aureus* cell-cell interactions and biofilm formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1029-1038.

Kato, M., Mizuno, T., Shimizu, T., and Hakoshima, T. (1997). Insights into multistep phosphorelay from the crystal structure of the C-terminal HPt domain of ArcB. *Cell* 88, 717-723.

Khlebnikov, A., Datsenko, K.A., Skaug, T., Wanner, B.L., and Keasling, J.D. (2001). Homogeneous expression of the P_{BAD} promoter in *Escherichia coli* by constitutive expression of the low-affinity high-capacity AraE transporter. *Microbiology* 147, 3241-3247.

Kim, Y.K., and McCarter, L.L. (2007). ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 189, 4094-4107.

Kulshina, N., Baird, N.J., and Ferre-D'Amare, A.R. (2009). Recognition of the bacterial second messenger cyclic diguanylate by its cognate riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1212-1217.

Kumagai, Y., Cheng, Z., Lin, M., and Rikihisa, Y. (2006). Biochemical activities of three pairs of *Ehrlichia chaffeensis* two-component regulatory system proteins involved in inhibition of lysosomal fusion. *Infect. Immun.* 74, 5014-5022.

Lai, T.H., Kumagai, Y., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Rikihisa, Y. (2009). The *Anaplasma phagocytophilum* PleC histidine kinase and PleD diguanylate cyclase two-component system and role of cyclic Di-GMP in host cell infection. *J. Bacteriol.* 191, 693-700.

Lam, H., Oh, D.C., Cava, F., Takacs, C.N., Clardy, J., de Pedro, M.A., and Waldor, M.K. (2009). D-amino acids govern stationary phase cell wall remodeling in bacteria. *Science* 325, 1552-1555.

Lara-Tejero, M., and Galan, J.E. (2009). *Salmonella enterica* serovar typhimurium pathogenicity island 1-encoded type III secretion system translocases mediate intimate attachment to nonphagocytic cells. *Infect. Immun.* 77, 2635-2642.

Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003). F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* 224, 1-15.

Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y., and Lory, S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 65, 1474-1484.

Maiti, D., Das, B., Saha, A., Nandy, R.K., Nair, G.B., and Bhadra, R.K. (2006). Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. *Microbiology* 152, 3633-3641.

Matson, J.S., Withey, J.H., and DiRita, V.J. (2007). Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 75, 5542-5549.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280, 605-608.

Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824-1827.

Miller, J.H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics*. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).

Mougel, C., and Zhulin, I.B. (2001). CHASE: an extracellular sensing domain common to transmembrane receptors from prokaryotes, lower eukaryotes and plants. *Trends Biochem. Sci.* 26, 582-584.

Nandi, S., Maiti, D., Saha, A., and Bhadra, R.K. (2003). Genesis of variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor: role of the CTX ϕ array and its position in the genome. *Microbiology* 149, 89-97.

Navaneethan, U., and Giannella, R.A. (2008). Mechanisms of infectious diarrhea. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 637-647.

Nelson, E.J., Chowdhury, A., Flynn, J., Schild, S., Bourassa, L., Shao, Y., LaRocque, R.C., Calderwood, S.B., Qadri, F., and Camilli, A. (2008). Transmission of *Vibrio cholerae* is antagonized by lytic phage and entry into the aquatic environment. PLoS Pathog. 4, e1000187.

Nelson, E.J., Harris, J.B., Morris, J.G., Jr., Calderwood, S.B., and Camilli, A. (2009). Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. Nat. Rev. Microbiol. 7, 693-702.

Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J., and Payne, S.M. (1998). *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are linked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. Mol. Microbiol. 29, 1493-1507.

Pang, B., Yan, M., Cui, Z., Ye, X., Diao, B., Ren, Y., Gao, S., Zhang, L., and Kan, B. (2007). Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. J. Bacteriol. 189, 4837-4849.

Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H., and Jenal, U. (2007). Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. J. Biol. Chem. 282, 29170-29177.

Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B., and Jenal, U. (2004). Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain. Genes Dev. 18, 715-727.

Pogliano, J., Osborne, N., Sharp, M.D., Abanes-De Mello, A., Perez, A., Sun, Y.L., and Poglian, K. (1999). A vital stain for studying membrane dynamics in bacteria: a novel mechanism controlling septation during *Bacillus subtilis* sporulation. Mol. Microbiol. 31, 1149-1159.

Prescott, L., Harley, J.P., and Klein, D.A. (1995). Prescott, Harley, Klein - Microbiologie, deuxième édition. (United States: W. C. Brown Publishers).

Provenzano, D., and Klose, K.E. (2000). Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10220-10224.

Provenzano, D., Schuhmacher, D.A., Barker, J.L., and Klose, K.E. (2000). The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect. Immun.* 68, 1491-1497.

Rahman, M.H., Biswas, K., Hossain, M.A., Sack, R.B., Mekalanos, J.J., and Faruque, S.M. (2008). Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains. *DNA Cell Biol.* 27, 347-355.

Reidl, J., and Klose, K.E. (2002). *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 125-139.

Römling, U., Gomelsky, M., and Galperin, M.Y. (2005). C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Mol. Microbiol.* 57, 629-639.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., *et al.* (1987). Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* 325, 279-281.

Rost, B., Fariselli, P., and Casadio, R. (1996). Topology prediction for helical transmembrane proteins at 86% accuracy. *Protein Sci.* 8, 1704-1718.

Russel, M., and Kazmierczak, B. (1993). Analysis of the structure and subcellular location of filamentous phage pIV. *J. Bacteriol.* 175, 3998-4007.

Ryan, R.P., McCarthy, Y., Andrade, M., Farah, C.S., Armitage, J.P., and Dow, J.M. (2010). Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 5989-5994.

Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O.V., and Gomelsky, M. (2005). Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J. Bacteriol.* 187, 1792-1798.

Schild, S., Bishop, A.L., and Camilli, A. (2008). Ins and outs of *Vibrio cholerae*. *Microbe* 3, 131-136.

Schirmer, T., and Jenal, U. (2009). Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 724-735.

Shapiro, L., McAdams, H.H., and Losick, R. (2009). Why and how bacteria localize proteins. *Science* 326, 1225-1228.

Sharp, M.D., and Pogliano, K. (1999). An *in vivo* membrane fusion assay implicates SpoIIIE in the final stages of engulfment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14553-14558.

Silva, A.J., and Benitez, J.A. (2004). Transcriptional regulation of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease by the cyclic AMP receptor protein and RpoS. *J. Bacteriol.* 186, 6374-6382.

Singer, M., Baker, T.A., Schnitzler, G., Deischel, S.M., Goel, M., Dove, W., Jaacks, K.J., Grossman, A.D., Erickson, J.W., and Gross, C.A. (1989). A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 53, 1-24.

Slamti, L., and Waldor, M.K. (2009). Genetic analysis of activation of the *Vibrio cholerae* Cpx pathway. *J. Bacteriol.* 191, 5044-5056.

Smith, K.D., Lipchock, S.V., Ames, T.D., Wang, J., Breaker, R.R., and Strobel, S.A. (2009). Structural basis of ligand binding by a c-di-GMP riboswitch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1218-1223.

Steinberger, O., Lapidot, Z., Ben-Ishai, Z., and Amikam, D. (1999). Elevated expression of the CD4 receptor and cell cycle arrest are induced in Jurkat cells by treatment with the novel cyclic dinucleotide 3',5'-cyclic diguanylic acid. *FEBS Lett.* 444, 125-129.

Stock, A.M. (2007). Diguanilate cyclase activation: it takes two. *Structure* 15, 887-888.

Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., and Breaker, R.R. (2008). Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. *Science* 321, 411-413.

Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., Mayer, R., Ross, P., Amikam, D., Weinhouse, H., *et al.* (1998). Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *J. Bacteriol.* 180, 4416-4425.

Tamayo, R., Pratt, J.T., and Camilli, A. (2007). Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 131-148.

Taylor, B.L. (2007). Aer on the inside looking out: paradigm for a PAS-HAMP role in sensing oxygen, redox and energy. *Mol. Microbiol.* 65, 1415-1424.

Thanbichler, M., and Shapiro, L. (2008). Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 28-40.

Thompson, F.L., Austin, B., and Swings, J. (2006). *The biology of Vibrios*. (Washington).

Tini, M., Jewell, U.R., Camenisch, G., Chilov, D., and Gassmann, M. (2002). Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 569-574.

Tischler, A.D., and Camilli, A. (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 53, 857-869.

Tüzün Güvener, Z., and Harwood, C.S. (2007). Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Mol. Microbiol.* 66, 1459-1473.

Waldor, M.K., and RayChaudhuri, D. (2000). Treasure trove for cholera research. *Nature* 406, 469-470.

Waldor, M.K., Tschape, H., and Mekalanos, J.J. (1996). A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 178, 4157-4165.

Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and Bassler, B.L. (2008). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. *J. Bacteriol.* 190, 2527-2536.

Weinberg, Z., Barrick, J.E., Yao, Z., Roth, A., Kim, J.N., Gore, J., Wang, J.X., Lee, E.R., Block, K.F., Sudarsan, N., *et al.* (2007). Identification of 22 candidate structured RNAs in bacteria using the CMfinder comparative genomics pipeline. *Nucleic. Acids Res.* 35, 4809-4819.

Westenberg, D.J., Gunsalus, R.P., Ackrell, B.A., Sices, H., and Cecchini, G. (1993). *Escherichia coli* fumarate reductase *frdC* and *frdD* mutants. Identification of amino acid residues involved in catalytic activity with quinones. *J. Biol. Chem.* 268, 815-822.

Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J. Bacteriol.* 190, 463-475.

Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2010). The second messenger cyclic-di-GMP. (Washington: ASM Press).

Wozniak, R.A., Fouts, D.E., Spagnoletti, M., Colombo, M.M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Dery, C., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 5, e1000786.

Wozniak, R.A., and Waldor, M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 552-563.

Yildiz, F.H., Liu, X.S., Heydorn, A., and Schoolnik, G.K. (2004). Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol. Microbiol.* 53, 497-515.